

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Departamento de Bioquímica**



**TESIS DOCTORAL**

**Aislamiento de antígenos cancerosos específicos de la  
membrana plasmática de la célula cancerosa**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Ana Margarita Pozo Méndez**

**Madrid, 2015**

70  
253  
201

Ana Margarita Pozo Méndez



X-23-00-250-6

**AISLAMIENTO DE ANTIGENOS CANCEROSOS ESPECIFICOS DE LA MEMBRANA  
 PLASMATICA DE LA CELULA CANCEROSA**

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1983



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

251/83

© Ana Margarita Pozo Méndez  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1983  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-39687-1983

ANA MARGARITA DEL POZO MENDEZ

AISLAMIENTO DE ANTIGENOS CANCEROSOS ESPECIFICOS DE LA  
MEMBRANA PLASMATICA DE LA CELULA CANCEROSA

*Tesis doctoral dirigida por el  
Dr. Ysidro Valladares Sánchez,  
Profesor de Investigación del  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas,  
Director del Departamento de Bioquímica Oncológica,  
centro coordinado del C.S.I.C.,  
Instituto Nacional de Oncología,  
Madrid 3*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION DE QUIMICAS  
AÑO 1981



## II

### AGRADECIMIENTO

Este trabajo de investigación ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica Oncológica, del Instituto Nacional de Oncología (Ministerio del Trabajo, Sanidad y Seguridad Social), centro coordinado del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. A través de una ayuda privada al jefe del Departamento se recibe una importante subvención de la Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer, que ayuda a financiar todas las investigaciones. Doy pues las gracias a dicha Fundación por haber contribuido a que este trabajo se llevara a cabo.

Mi agradecimiento también al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, que me ha hecho beneficiaria de una beca predoctoral, estimulando así mi dedicación a la investigación.

Agradezco mucho al Dr. Ysidro Valladares Sánchez, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y jefe del Departamento de Bioquímica Oncológica, así como al Dr. Ysmael Alvarez Rodríguez, jefe adjunto del mismo, su ayuda moral y material durante la dirección científica de este trabajo.

Gracias al Profesor A. Martín Municio, jefe del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Complutense de Madrid, por considerar digna de presentación a esta memoria para optar al grado de doctor.

Agradezco asimismo la inestimable ayuda de la Dra. Josefa Alvarez Noves en el curso de los experimentos y a Rocío Alvarez por la transcripción del manuscrito y la labor fotográfica.

### III

Estoy también cariñosamente reconocida por su ayuda y grata compañía a mis compañeros y amigos Alicia Ruano, Ma. Dolores Briones, Aurora Muñoz, Elena Algarra, Concepción Relaño, José Vicente García y Aureliano Alvarez.

#### IV

#### PROLOGO

El Departamento de Bioquímica Oncológica tiene planteado un ambicioso programa de inmunoterapia activa específica corregida del cáncer, financiado por la Administración Institucional de la Sanidad Nacional (AISNA), del Ministerio del Trabajo, Sanidad y Seguridad Social, el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, la Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer y la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, del Ministerio de Educación y Ciencia.

El proyecto desarrollado en este trabajo forma parte de dicho programa.

Actualmente se aplica la inmunoterapia o la modulación inespecíficas del cáncer, por ejemplo, con BCG, su residuo de extracción metanólica o MER, el *Corynebacterium parvum*, el levamisol y, en pleno desarrollo, el interferón.

En fase experimental se halla la inmunoterapia específica que, de momento, se sirve de células cancerosas enteras desvitalizadas por irradiación y aumentada su inmunogenicidad por tratamiento con iodoacetato. También se han empleado extractos antigénicos brutos o complejos antigénicos.

Pero, la verdad, es que no se han aislado y caracterizado los antígenos oncoasociados y oncoespecíficos y por lo tanto, no existe todavía una inmunoterapia activa específica genuina, digna de tal nombre.

En el terreno del aislamiento y caracterización de los antígenos oncoasociados y oncoespecíficos, este trabajo pretende conseguir la primera parte: obtener antígenos cancerosos de tipos específico y asociado.



Para ello hemos planeado una serie de experimentos originales que combinan una metodología biológica y bioquímica, la cual incluye una técnica de inmunización selectiva en conejos quimera inmunológica para la obtención de anticuerpos anticancerosos específicos, la purificación de las inmunoglobulinas específicas mediante reciclo ascendente en columna cromatográfica de cuentas de 10-40  $\mu$ m de diámetro, de dextrano entrelazado con epíclorohidrina y la cromatografía de afinidad en agarosa activada con bromuro de cianógeno entre inmunoglobulinas anticancerosas específicas y antígenos de membrana plasmática de células cancerosas solubilizadas por fragmentación ultrasónica.

Hemos alcanzado este primer objetivo, si bien, para ser sinceros, no está completo. Con la metodología utilizada conseguimos obtener un complejo de antígenos oncoasociados y oncoespecíficos en pequeña cantidad. Es necesario ahora pensar en una técnica preparativa para poder individualizar y caracterizar cada antígeno.

VI

INDICE

	<u>Páginas</u>
<u>INTRODUCCION</u>	1
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	15
I. CULTIVO DE TEJIDOS ESTACIONARIOS EN MONOCAPA	15
A. <u>Características de las células utilizadas.</u>	15
A.1. Células HeLa.	15
A.2. Células EREA.	17
B. <u>Técnica de subcultivo.</u>	17
C. <u>Soluciones y medios de cultivo.</u>	19
II. CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSION	22
A. <u>Características de las células utilizadas.</u>	22
A.1. Células CAE.	22
B. <u>Técnica de subcultivo.</u>	22
III. CULTIVO DE CELULAS "IN VIVO"	24
A. <u>Características de las células utilizadas.</u>	24
A.1. Células CAEL.	24
B. <u>Técnica de trasplante.</u>	24
IV. AISLAMIENTO DE LA MEMBRANA PLASMATICA	24
A. <u>Técnica utilizada.</u>	24
A.1. Para células cultivadas "in vitro".	25
A.2. Para células cultivadas "in vivo".	28

## VII

A.3. Para tejidos.	28
B. <u>Disoluciones empleadas</u>	30
V. SOLUBILIZACION DE LA MEMBRANA PLASMATICA	32
A. <u>Técnica utilizada.</u>	33
B. <u>Disoluciones empleadas.</u>	34
VI. INMUNIZACION DE CONEJOS	34
A. <u>Técnica de inmunización simple.</u>	35
B. <u>Técnica de inmunización en conejos quimera</u> <u>inmunológica.</u>	36
VII. OBTENCION DE INMUNOSUEROS	36
A. <u>Técnica.</u>	36
VIII. AISLAMIENTO DE INMUNOGLOBULINAS POR CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN RECICLO ASCENDENTE	37
A. <u>Técnica.</u>	40
B. <u>Disoluciones empleadas.</u>	42
IX. AISLAMIENTO DE ANTIGENOS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD	43
A. <u>Técnica.</u>	44
A.1. Preparación del lecho.	44
A.2. Oferta de la mezcla de antígenos.	45
B. <u>Disoluciones empleadas.</u>	48
X. VALORACION DE PROTEINAS	50
A. <u>Técnica de análisis.</u>	50
B. <u>Disoluciones empleadas.</u>	51
XI. INMUNODIFUSION	53
A. <u>Técnica.</u>	53

## VIII

B. <u>Disoluciones empleadas.</u>	55
XII. INMUNOELECTROFORESIS	56
A. <u>Técnica.</u>	56
B. <u>Disoluciones empleadas.</u>	57
XIII. MICROMETODO PARA TITULACION DE CITOTOXICIDAD	58
A. <u>Técnica de titulación de citotoxicidad de los</u> <u>antisueros.</u>	58
B. <u>Técnica de titulación de inhibición de citotoxicidad</u> <u>de los antisueros previamente absorbidos con anti-</u> <u>genos.</u>	59
XIV. PRUEBA DEL ANILLO	59
A. <u>Técnica.</u>	60
XV. CURVA DE PRECIPITACION CUANTITATIVA	60
A. <u>Técnica.</u>	60
XVI. INMUNOGENICIDAD	61
A. <u>Técnica.</u>	61
XVII. INMUNOPEROXIDASAS	62
A. <u>Técnica de conjugación.</u>	62
B. <u>Técnica para la observación al microscopio óptico.</u>	63
C. <u>Técnica para la observación al microscopio electro-</u> <u>nico.</u>	64
D. <u>Disoluciones empleadas.</u>	65
XVIII. MEDIDA DE RADIATIVIDAD	67
A. <u>Técnica.</u>	67
B. <u>Disoluciones empleadas.</u>	68

## IX

XIX. METODOS CITOLOGICOS	68
A. <u>Técnica de fijación y tinción de cultivos celulares.</u>	68
B. <u>Técnica para recuento de células totales.</u>	69
C. <u>Técnica para recuento de viabilidad celular.</u>	69
D. <u>Disoluciones, fijadores y colorantes empleados.</u>	70
<u>RESULTADOS</u>	72
I. OBTENCION DE LA MEMBRANA PLASMATICA	72
A. <u>Ensayos previos.</u>	72
A.1. Homogeneización.	72
A.2. Estudio del gradiente de sacarosa.	85
B. <u>Resultados.</u>	99
B.1. Células HeLa.	99
B.2. Células CAEL.	99
B.3. Células CAE.	100
B.4. Tejidos normales.	101
II. SOLUBILIZACION DE MEMBRANAS	101
A. <u>Estudio de agregación.</u>	101
A.1. Factores que influyen en la agregación y evolución en el tiempo.	102
A.2. Disoluciones empleadas.	114
III. INMUNOSUEROS OBTENIDOS	118
A. <u>Inmunosuero anti-peroxidasas.</u>	118
A.1. Prueba del anillo.	118

# X

A.2. Título del inmunosuero.	119
A.3. Curva de precipitación cuantitativa.	119
A.4. Punto de equivalencia.	119
A.5. Valencia antigénica.	120
B. <u>Inmunosueros anti-membranas.</u>	120
B.1. Prueba del anillo.	122
B.2. Micrométodo para titulación de citotoxicidad	123
a. Inmunosuero anti-membranas de células normales.	123
b. Inmunosuero anti-membrana de células CAEL.	123
c. Inmunosuero anti-membrana de células CAEL obtenido de conejos quimerizados.	124
c.1. Valoración cualitativa de los inmunosueros obtenidos por dife- rentes procedimientos.	127
c.2. Especificidad de los anticuer- pos obtenidos por inmunización selectiva en conejos quimera inmunológica.	131
IV. AISLAMIENTO DE INMUNOGLOBULINAS	134
A. <u>Ensayos previos.</u>	134
B. <u>Resultados.</u>	144
V. OBTENCION DE ANTIGENOS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD	150
A. <u>Pruebas previas.</u>	150

## XI

A.1. Estudio de la desnaturalización del ligando.	150
A.2. Fijación de proteínas a Sepharosa 4B activa- da con CNBr.	151
B. <u>Experimentos control.</u>	151
B.1. Sistema peroxidasas/anticuerpos antipero- xidasas.	151
C. <u>Obtención de antígenos oncoespecíficos y oncoaso-     ciados.</u>	172
C.1. Cromatografía de afinidad en microcolumnas con antígenos radiactivos.	172
C.2. Sistema membranas de CAEL/anticuerpos anti- antígenos normales.	186
C.3. Sistema membranas de CAEL/anticuerpos anti- antígenos cancerosos.	188
VI. PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD	191
<u>DISCUSION</u>	216
I. INTRODUCCION Y ESQUEMA GENERAL DEL PROYECTO	216
II. OBTENCION DE FRAGMENTOS DE MEMBRANA PLASMATICA SOLUBILIZADA	219
III. OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTICANCEROSOS ESPECIFICOS	221
IV. OBTENCION DE ANTIGENOS CANCEROSOS ESPECIFICOS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD	223
<u>CONCLUSIONES</u>	234







### INTRODUCCION

Uno de los objetivos prioritarios en la investigación oncológica ha sido la búsqueda de diferencias en la composición de las células cancerosas y normales capaces de inducir una respuesta inmunológica.

Durante mucho tiempo se debatió la existencia de estas diferencias, pero el desarrollo de las técnicas inmunológicas experimentales permitió demostrar la presencia en las células cancerosas de antígenos no detectables en las células normales de los tejidos homólogos.

P. Ehrlich (1906) demostró que los ratones a los que se trasplantaba un tumor eran capaces de rechazar un segundo trasplante del mismo tumor. L. Gross (1943) utilizó cepas ínsitas de ratones (animales homocigóticos resultantes del cruce consanguíneo durante 25 generaciones) logrando una mayor supervivencia en los grupos de animales que habían sido previamente inmunizados con las mismas células tumorales. Gross provocó sarcomas con metilcolantreno y los trasplantó a ratones singénicos mediante inoculación intradérmica. Alrededor del 20 % de los animales desarrollaron durante cierto tiempo tumores intradérmicos que luego regresaron; estos ratones eran resistentes a posteriores trasplantes de la misma línea tumoral.

Diez años más tarde, E.J. Foley (1953) obtuvo los mismos resultados estudiando la capacidad de rechazo de isotrasplantes de tumores inducidos por metilcolantreno en animales en los que se había hecho regresar el mismo tumor interrumpiendo la circulación por ligadura vascular. Los ratones empleados por Foley eran endogámicos pero no isoantigénicos y sus resultados fueron criticados dada la posible influencia de factores heterocigoti-

cos residuales.

En 1957 estos experimentos fueron ampliados y confirmados por R.T. Prehn y J.M. Main, quienes eliminaron el problema de los factores heterozigóticos residuales utilizando animales adecuados, dejando así totalmente demostrada la existencia de antígenos específicos en las células cancerosas.

En los tumores inducidos por cancerígenos químicos, los antígenos encontrados se comportaban como específicos de cada tumor e individuales, es to es, dos tumores inducidos en el mismo animal por el mismo cancerígeno demostraban propiedades antigénicas diferentes y particulares, no existiendo reacciones cruzadas entre los antígenos de ambos tumores.

En los tumores producidos por virus oncógenos se pudo demostrar posteriormente que, además de antígenos específicos de cada tumor, se pueden detectar antígenos comunes muy potentes en todos los tumores producidos por un mismo virus, sea en distintos animales de la misma raza, en distintas razas de una misma especie, e incluso en tumores inducidos por el mismo virus en animales de distintas especies. Las células tumorales que presentan la mayor gama de antígenos son las transformadas por virus oncógenos; en ellas se pueden distinguir:

1. Antígenos que forman parte de las partículas víricas maduras,
2. antígenos necesarios durante la síntesis de los anteriores y
3. antígenos viroinducidos:

a) que solo funcionan como recuerdo del desarrollo filogenético, pueden dar lugar a reacciones cruzadas,

b) que solo funcionan como recuerdo de algunos momentos del

desarrollo ontogénico, como pueden ser los antígenos embrionarios y

c) que ponen en marcha funciones específicas de las distintas células plenamente diferenciadas.

En la tabla I tomada de Y. Valladares (1977), se puede ver la complejidad y variedad antigénica de los virus de la leucemia murina. Estos antígenos pueden ser detectados en todos los tumores inducidos por estos virus (F. Lilly y R. Steeves, 1974).

En la tabla II se relacionan los antígenos detectables en las células linfoides humanas transformadas por el virus de Epstein-Barr. Este agente es el más probable candidato de etiología vírica de un tumor humano, el linfoma de Burkitt, pero parecen existir otros herpesvirus relacionados con tumores humanos (H. zur Hausen, 1975; Y. Valladares, 1977).

En la tabla anterior se hace referencia a las técnicas utilizadas para identificar los antígenos tumorales conocidos, pero existen además otros antígenos en ese modelo que solo pueden detectarse por experimentos de rechazo de trasplante.

Por sí solos los procedimientos que estudian el rechazo de trasplante permiten determinar un número muy limitado de antígenos, ya que solo detectan aquellos antígenos que son inmunogénicos y eficaces, o sea, que son capaces de inducir una respuesta inmunológica efectiva contra las células tumorales. Hoy sabemos que existen, además, numerosos antígenos que son inmunogénicos pero no eficaces, es decir, que inducen una respuesta inmunológica, detectable por distintos procedimientos, pero incapaz de rechazar al tumor y sabemos que existen también antígenos tumorales no inmunogénicos, que no provocan ningún tipo de respuesta y que solo pueden ser detectados por

TABLA I

## ANTIGENOS DE LOS VIRUS DE LA LEUCEMIA MURINA (MuLV)

- 1) Glicoproteínas 69-71 (gp69/71) = antígeno interespecífico II; 8 % de las proteínas víricas; antígeno interespecífico (2 moléculas de 69.000 y 71.000 daltons); forma la cubierta. El antígeno gp69/71 se ha encontrado en algunos tumores humanos.
- 2) Proteína 12 (p12) (12.000 daltons); posee determinantes de grupo y de tipo; es superficial.
- 3) VEA («Virus Envelope Antigens»):  
 Subgrupo vírico MuLV-1: específico del virus de Gross.  
 Subgrupo vírico MuLV-2:  
 Tipo A: Virus LLV-Friend, virus de Graffi, virus B/T-L de Tennant, virus SimLV, virus de Rowson-Parr.  
 Tipo B: Virus de Moloney, virus de Abelson.  
 Tipo C: LLV-Rauscher, virus de Rich, virus de Breyer-Moloney.  
 Tipo D: Virus de Buffet 334C.
- 4) gs-1 (group specific-1) 30 % de las proteínas víricas; envuelve al nucleóide; especie-específico (sólo en virus murinos) = antígeno interespecífico I = proteína 30 (p30) (30.000 daltons) contiene el determinante gs-3. Antígeno interespecífico (en virus de ratón, rata, criceto y gato, pero no en virus de pollo y primates). p30 se ha encontrado recientemente en algunos tumores humanos.
- 5) Transcriptasa inversa, 70.000 daltons, es subunidad de un complejo proteico mayor. Se encuentra en el nucleóide. Posee determinantes interespecíficos y de grupo. La contienen algunos tumores humanos.
- 6) Proteína 15 (p15) (15.000 daltons). Antígeno del nucleóide no asociado a la RNP.
- 7) Proteína 10 (p10) (10.000 daltons); se asocia a la RNP del nucleóide; es grupo-específica.
- 8) CSA («Cell Surface Antigens»):  
 Grupo G (antígenos de la leucemia de Gross): antígeno G y antígeno Gix. El antígeno G existe sólo en membrana celular y en forma soluble en el suero, pero no en el virión; el antígeno Gix es controlado genéticamente y aparece en linfocitos AKR no leucémicos y en tino de cepas como la 129, carente de MuLV.  
 Grupo FMR (Friend-Moloney-Rauscher). Existe en los virus de Friend, Moloney, Rauscher y Graffi. El antígeno FMR se revela en la superficie celular y en forma soluble en el suero. No obstante, parece existir antígeno FMR en proyecciones de la cubierta, en forma no inmunogénica.
- 9) NA: antígenos nucleares viroinformados y viroinducidos.

TABLA II

ANTIGENOS ESPECIFICOS DE LAS LINEAS CELULARES Y TUMORES RELACIONADOS  
CON EL VIRUS DE EPSTEIN-BARR (EBV)

ANTIGENO	LOCALIZACION	EXPRESION	METODO DE DEMOSTRACION
ANTIGENO NUCLEAR DE EPSTEIN-BARR (EBNA) (1)	NUCLEO (CROMATINA Y CROMOSOMAS)	IN VIVO E IN VITRO	INMUNOFLUORESCENCIA ANTI- COMPLEMENTARIA Y FIJACION DEL COMPLEMENTO
ANTIGENO DE MEMBRANA (NA) (2)	PRECOC (EMA) (3)	IN VIVO E IN VITRO	INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA O INDIRECTA
	TARDIO (LMA) (4)	IN VIVO E IN VITRO	INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA O INDIRECTA
ANTIGENO PRECOZ (EA) (5)	DIFUSO (D) (6)	IN VIVO E IN VITRO	INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA O INDIRECTA
	RESTRINGIDO (R) (7)	IN VIVO E IN VITRO	INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA O INDIRECTA
ANTIGENO DE LA CAPSIDE VIRICA (VCA) (8)	NUCLEO Y CITOPLASMA	IN VIVO E IN VITRO	INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA O INDIRECTA Y FIJACION DE COMPLEMENTO
	CITOPLASMA	IN VIVO E IN VITRO	INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA O INDIRECTA Y FIJACION DE COMPLEMENTO
ANTIGENO SOLUBLE (SA) (9)	NUCLEO Y CITOPLASMA	IN VIVO E IN VITRO	INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA O INDIRECTA Y FIJACION DE COMPLEMENTO
	CITOSOL Y CIRCULANTE	IN VIVO E IN VITRO	INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA O INDIRECTA Y FIJACION DE COMPLEMENTO Y CITOTOXICIDAD

ABREVIATURAS: (1) EBNA por Epstein-Barr nuclear antigen; (2) MA por membrane antigen; (3) EMA por early membrane antigen; (4) LMA por late membrane antigen; (5) EA por early antigen; (6) D por diffuse; (7) R por restricted; (8) VCA por viral capsid antigen; (9) SA por soluble antigen.

reacciones heterólogas.

La falta de eficacia de algunos antígenos para promover una respuesta inmunológica es uno de los tópicos más apasionantes de la inmunología tumoral. La capacidad de respuesta ante cualquier antígeno está genéticamente controlada y los genes implicados en este control íntimamente relacionados con los que determinan los antígenos de histocompatibilidad (I. Green, 1974). Por otra parte, el sistema de vigilancia inmunológica juega un papel muy importante en el reconocimiento y la respuesta del organismo contra cualquier antígeno, de tal manera que antígenos propios del organismo que se producen en las primeras fases del desarrollo embrionario y dejan de producirse antes de que se desarrolle el sistema inmunológico pueden ser capaces de despertar ulteriormente una respuesta inmunológica (enfermedades autoinmunes). Por el contrario, antígenos extraños al organismo que se produzcan antes de la maduración del sistema de vigilancia inmunológica, pueden ser aceptados parcialmente como propios para impedir una respuesta inmunológica intensa que sería letal para el organismo (coriomeningitis linfocitaria).

Utilizando diversas técnicas (R. Weil, 1978) se ha demostrado la existencia en distintas células tumorales de antígenos que no corresponden al tipo histológico del que deriva el tumor, pero que son normales y se expresan habitualmente en otros tejidos adultos del mismo organismo. También se han descubierto en muchos tumores antígenos que no están presentes en las células normales adultas, pero que sin embargo se producen en distintos momentos del desarrollo embrionario y fetal.

En la tabla III, tomada de Y. Valladares (1977), se recogen algunos de los antígenos humanos bien caracterizados que inducen reacciones inmunoló-

TABLA III

ANTIGENOS DE MEMBRANA INDUCTORES DE REACCIONES  
INMUNOLOGICAS CITOTOXICAS

Tipo de tumor y antígenos	Movilidad electroforé- tica en PAGE (en cm)	Composición química	P. M. aproximado (*)
CARCINOMA EPIDERMÓIDE			
Ag F 1	5,3	Proteína	51.000 d
Ag F 2	8,4	Lipoproteína	100.000 d
Ag F 3	9,2	Proteína	400.000 d
Ag F 4	10,2	Proteína	500.000 d
Ag HSV TA	3,25; 3,85	Proteína	61.000 d; 40.000 d
ADENOCARCINOMA			
Ag F 3	9,2	Proteína	400.000 d
Ag F 4	10,2	Proteína	500.000 d
Ag TA 1	5,4	Proteína	51.000 d
Ag TA 2	7,3	Proteína	80.000 d
TUMOR DE CELULAS DE AVENA			
Ag TA 1	5,4	Proteína	51.000 d
Ag TA 2	7,3	Proteína	80.000 d
Ag TA 3	6,6	Lipoproteína	76.500 d
PULMON FETAL DE 7-8 SEMANAS			
Ag F 1	5,3	Proteína	51.000 d
Ag F 3	9,2	Proteína	400.000 d
Ag F 4	10,2	Proteína	500.000 d
PULMON FETAL DE 9 MESES Y PULMON ADULTO NORMAL			
Ag F 2	8,4	Lipoproteína	100.000 d

Ag = Antígeno  
 f = fetal  
 TA = Tumor asociado  
 HSV = Herpesvirus simplex hominis tipo I

\* Juzgado por el P. M. de proteínas tipo de movilidad electroforética similar.  
 PAGE = electroforesis en geles de poliacrilamida.



gicas de citotoxicidad en los tumores de pulmón. Gran parte de esos antígenos son embrionarios o fetales.

Los antígenos fetales han sido revisados por varios autores, entre los que se puede destacar P. Alexander (1972).

Los antígenos oncofetales pueden aparecer en cualquier tipo de célula cancerosa, son macromoléculas presentes en el feto y generalmente ausentes en el individuo normal adulto. Representan el fenómeno de expresión retro-genética.

Ya en 1906, G. Schöne encontró que inyectando ratones con tejidos fetales, éstos adquirían capacidad de rechazar trasplantes de tejidos tumorales, mientras que los tejidos adultos no producían esta respuesta.

En 1930, L. Hirsfeld y W. Malber detectaron la presencia de antígenos embrionarios en extractos de tumores, pero no se estudiaron bien hasta mucho después debido a las cantidades tan pequeñas que se encontraban, que necesitaban técnicas más sofisticadas desarrolladas posteriormente, como el radioinmunoensayo.

En 1963, G.I. Abelev estableció que la  $\alpha$ -fetoproteína encontrada en los tumores de hígado era antigénicamente idéntica a una  $\alpha$ -globulina detectada en 1957 por C. Bergstrand y B. Czar en fetos humanos, que es sintetizada por el parénquima del hígado fetal y por la extremidad cefálica del tubo embrionario digestivo.

La  $\alpha$ -fetoproteína tiene un peso molecular del orden de 72.000 D, movilidad  $\alpha$ , constante de sedimentación de 4,5 S y contiene 2,3 % de hidratos de carbono. Se puede detectar su presencia por doble difusión y radio-

inmunoensayo.

Otra proteína encontrada en células de origen fetal es la H ferroproteína encontrada por D. Buffe y cols. (1970); también se produce en el hígado fetal y está relacionada con la ferritina; es una  $\alpha$ -globulina.

En 1965, P. Gold y S. Freedman descubrieron una sustancia encontrada en el carcinoma de colon que denominaron antígeno carcinoembrionario (abreviado CEA, por carcino-embryonic antigen); este compuesto se detecta también en los órganos de fetos humanos de 2 a 6 meses.

Sobre los antígenos carcinoembrionarios se han realizado muchos estudios como el de P. Alexander (1972) o el de D.G. Pritchard y cols. (1978) sobre la química de estos compuestos.

El antígeno carcinoembrionario es una glicoproteína con una relación glúcidos:proteínas variable, del orden de 3:1, siendo el principal hidrato de carbono la N-acetilglucosamina. Es relativamente estable. Da un único pico en ultracentrifugación analítica, con un coeficiente de 6,85, según los estudios de J.E. Coligan y cols. (1972). Su peso molecular promedio estudiado por H.S. Slayter y J.E. Coligan (1975) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio es de 180.000 D.

En inmunolectroforesis en agar a pH 8,6 los CEA emigran a la región de las  $\beta$ -globulinas, según estudios de J. Krupey y cols. (1968).

También se han realizado estudios de los CEA al microscopio electrónico (H.S. Slayter y J.E. Coligan, 1975), que nos los muestran como una población homogénea de partículas con forma de varilla enroscada con dimensiones de 9 x 40 nm. Los CEA poseen una cadena polipeptídica simple, ya que

no se produce variación en su peso molecular por alquilación o reducción.

Los CEA tienen 6 puentes disulfuro con cistina y no tienen grupos cisteína libres, según las investigaciones de J.H. Westwood y P. Thomas (1975).

Debido a su alto contenido en hidratos de carbono son solubles en ácido perclórico, lo que permite separarlos del resto de las proteínas.

Su presencia puede ser detectada por inmunoelectroforesis, doble difusión y radioinmunoensayo.

Otra proteína de origen fetal es la encontrada por R.C. Nairn y cols. (1962), la sulfoglicoproteína fetal, que aparece en los carcinomas de estómago. En condiciones normales es un componente intestinal embrionario y fetal que desaparece después del nacimiento, pero que aparece de nuevo en las neoplasias, ya sean benignas o malignas.

Otros antígenos menos estudiados son  $\gamma$ -fetoproteína, que no tiene especificidad de especie y se ha descrito en el 75 % de los tejidos tumorales y el antígeno carcinofoetal glial (CFGA), descrito en gliomas humanos.

Si hubo una época en la que se dudaba de la existencia de antígenos propios de los tumores, hoy es tal la diversidad de antígenos tumorales que es necesario unificar conceptos y terminologías.

Al principio todos los autores describían como antígenos oncoespecíficos, tumor-específicos o cáncer-específicos a cualquiera de los antígenos detectados en un tumor que no existiesen en las células normales homólogas del mismo tipo de tejido y órgano. Así se viene hablando de antígenos tumor-específicos de rechazo de trasplante (abreviado TSTA por tumor specific transplantation antigen) o de antígenos tumor-específicos de la superficie celular (abreviado TSSA por tumor specific surface antigens).

Al descubrir que gran parte de los antígenos descritos como específicamente tumorales son unas veces antígenos víricos, otras veces proteínas normales que se presentan con una localización témporo-espacial anormal, antígenos embrionarios, fetales o ectópicos, algunos autores empezaron a hablar de antígenos oncoasociados en general, reservando el término de oncoespecíficos para designar aquellos antígenos intrínseca y específicamente relacionados con la transformación neoplásica y el carácter canceroso. Sin embargo, actualmente se siguen utilizando ambas terminologías.

Los antígenos oncoespecíficos y oncoasociados se pueden clasificar de acuerdo con distintos criterios. Podemos distinguir:

a) De acuerdo a su origen.

a.1) Propios del organismo

- embrionarios
- fetales
- ectópicos

a.2) Extraños al organismo

- víricos
- neoantígenos

b) De acuerdo a su capacidad para producir una respuesta inmunológica:

b.1) Inmunogénicos

- eficaces
- ineficaces

b.2) No inmunogénicos

c) De acuerdo con su localización topográfica a nivel de la célula

c.1.) Internos

- nucleares
- citoplásmicos
  - mitocondriales
  - ribosómicos
  - retículo-endoplasmáticos
  - solubles

c.2) Superficiales

- de la membrana plasmática o asociados a ella

Esta clasificación descriptiva, matizando la localización celular, permite conocer si las diferencias observadas en la inmunogenicidad de un antígeno dependen de su accesibilidad al reconocimiento y sobre todo a la respuesta del sistema inmunológico. Así, por ejemplo, sabemos que todos los antígenos TSTA son TSSA, pero no todos los antígenos TSSA son TSTA. E.W. Lamon (1974) ha estudiado la respuesta inmunológica frente a los antígenos oncoasociados inducidos por los virus y R.B. Herberman (1977) ha analizado el problema de la inmunogenicidad de los antígenos tumorales.

Las posibilidades de utilización práctica que pueden derivar de un mejor conocimiento de estos antígenos son muy grandes. Pero es necesario poner a punto procedimientos que permitan su aislamiento, identificación y purificación.

Esto fue lo que nos movió a planear una serie de experimentos con los cuales, combinando procedimientos biológicos y bioquímicos, fuéramos capa-

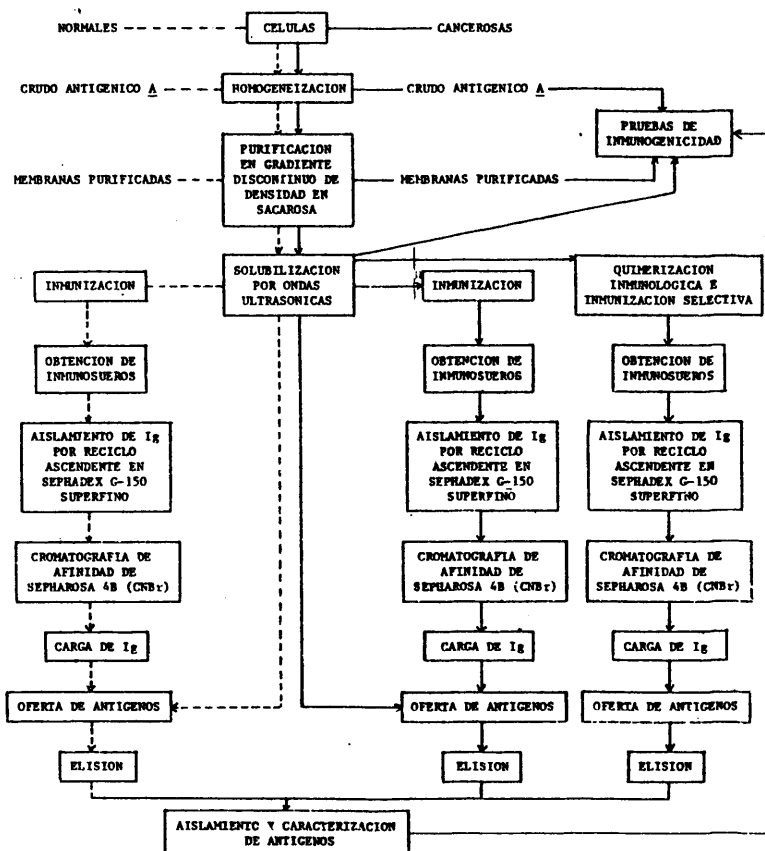
ces de aislar los antígenos oncoespecíficos y oncoasociados.

Al efecto diseñamos el proyecto esquematizado en la figura 1.

FIGURA 1

## AISLAMIENTO DE ANTIGENOS CANCEROSOS ESPECIFICOS

## ESQUEMA GENERAL



## MATERIAL Y METODOS

### I. CULTIVO DE TEJIDOS ESTACIONARIOS EN MONOCAPA

Se utilizaron las líneas celulares HeLa y EREA. Son líneas establecidas o continuas, ya que se han conseguido adaptar a crecer "in vitro" de forma potencialmente indefinida.

#### A. Características de las células utilizadas.

##### A.1. Células HeLa. (Figura 2).

Las células HeLa fueron establecidas por G.O. Gey, W.D. Coffman y M.T. Kubicek en 1951 a partir de un carcinoma epidermoide de cuello uterino humano, procedente de una mujer negra llamada Helen Lantsing, aprovechando las letras iniciales del nombre y apellido para la designación de la línea celular. Las células procedentes del tumor fueron cultivadas en medio esencial mínimo de Eagle en solución salina equilibrada de Hanks y suplementada con 10 % de suero de ternera.

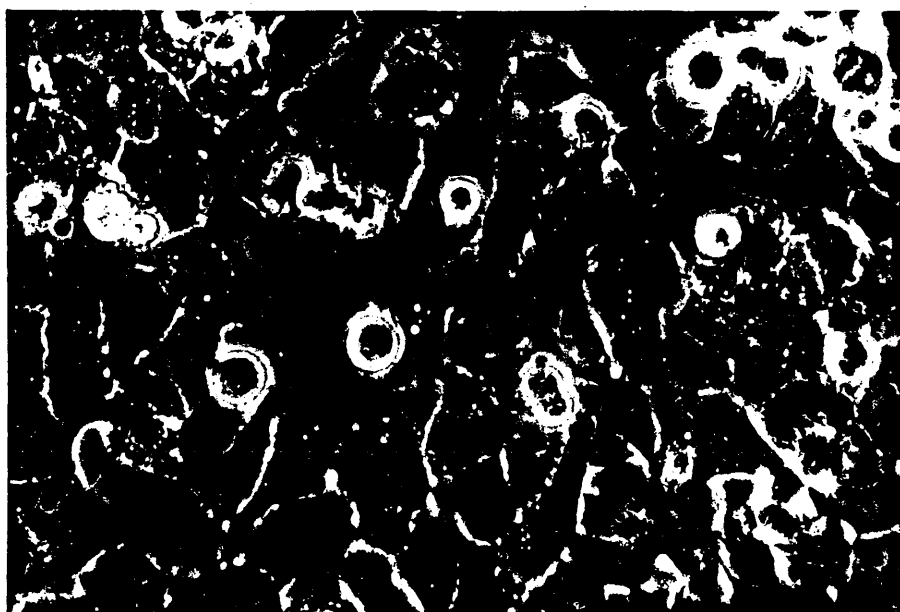
La caracterización de esta línea celular proporcionó los datos siguientes:

Morfología: epiteliode.

Ciclo celular: tiempo de generación, 19 horas; duración de la fase G1, 6 horas 25 minutos; duración de la fase S, 8 horas; duración de la fase G2, 3 horas 30 minutos y duración de la fase M 65 minutos.

Número de cromosomas: tronco con número modal de 82 cromosomas y



FIGURA 2

Aspecto de una monocapa preconfluente de células HeLa. Se observan numerosas mitosis. Esta línea celular se originó de un carcinoma epidermoide de cuello uterino humano.

un desperdigamiento del resto de la población entre 70 y 164 cromosomas.

Eficiencia de planqueo: 90 %.

Susceptible a virus: poliovirus 1 y adenovirus 2.

#### A.2. Células EREA. (Figura 3).

Esta línea celular fue establecida en nuestro Departamento en 1978. Las células proceden de un cultivo primario de células totales de embrión de ratón.

Entre sus características podemos destacar:

Morfología: a través de los subcultivos realizados durante varios años han mantenido dos tipos celulares, uno epitelioides y otro fibroblástico.

Número de cromosomas: el número modal de cromosomas es de 40 para las células fibroblásticas y de 70 para las epitelioides.

Tiempo de generación: 21 horas para las células fibroblásticas y 28 horas para las epitelioides.

Eficiencia de planqueo: menos del 10 % cuando se siembran 10.000 células/ml.

Tumorigenicidad: la inoculación de  $10^5$  a  $10^6$  células por vía subcutánea a ratones recién nacidos carece de propiedades tumorigénicas.

#### B. Técnica de subcultivo.

Ambos tipos de células se mantienen por subcultivos seriados, de acuerdo con los métodos estándar (R.C. Parker, 1961). Las células del cultivo anterior se desprenden con disolución de tripsina al 0,2 %, se prepara una suspensión celular homogénea y se hace un recuento del número de células. Se toman alícuotas que se siembran bien dispersadas en frascos de cul-

FIGURA 3



Preparación de células FREA. Se distinguen claramente los dos tipos celulares, epitelioides y fibroblastoide, que componen esta línea celular, procedente de células embrionarias de ratón.

tivo estériles, añadiendo la cantidad necesaria de medio de cultivo de forma que queden sembradas 100.000 células/ml, se incuban a 37°C y se mantienen con cambios periódicos de medio de crecimiento, generalmente a los 4 días. Cuando las células alcanzan el estado de confluencia en monocapa, se procede al siguiente subcultivo, lo que suele hacerse a los 7 días.

Las células se mantienen con medio esencial mínimo de Eagle suplementado con 10 % de suero de ternera y 1 % de aminoácidos no esenciales.

#### C. Soluciones y medios de cultivo.

##### 1. Rojo fenol al 1 %

Rojo fenol -----	10 g
NaOH 0,05 N -----	60 ml
H <sub>2</sub> O tridestilada -----	20 ml
Ajustar pH 7,0-7,5 con NaOH 0,05 N -----	5 ml
H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	100 ml

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

##### 2. GKN

Glucosa -----	1,0 g
KCl -----	0,4 g
NaCl -----	8,0 g
Rojo fenol al 1 % -----	1,0 ml
Agua tridestilada, c.s.p. -----	1000 ml

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

3. Tripsina al 0,2 %

Tripsina Difco 1:250 -----	2,0 g
GKN, c.s.p. -----	1000 ml

Esterilizar por filtración.

4. Medio esencial mínimo de Eagle modificado

Este medio se compone de las siguientes fracciones, referidas a

1 litro:

4.1. Mezcla de aminoácidos esenciales	g/l
L-Arginina-HCl -----	126,40
L-Cisteína -----	24,02
L-Glutamina -----	292,30
L-Histidina-HCl·H <sub>2</sub> O -----	41,90
L-Isoleucina -----	52,50
L-Leucina -----	52,50
L-Lisina-HCl -----	73,06
L-Metionina -----	14,09
L-Fenilalanina -----	33,02
L-Treonina -----	47,64
L-Triptofano -----	10,20
L-Tirosina -----	36,22
L-Valina -----	46,90
4.2. Mezcla de vitaminas	
Panteotenato de calcio -----	1,00
Cloruro de colina -----	1,00
Acido fólico -----	1,00

Nicotinamida -----	1,00
i-Inositol -----	2,00
Piridoxal-HCl -----	1,00
Riboflavina -----	0,10
Tiamina-HCl -----	1,00
4.3. Solución equilibrada de Hanks	.
$\text{ClCl}_2$ -----	0,14
D-Glucosa -----	1,00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -----	0,20
KCl -----	0,40
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ -----	0,06
NaCl -----	8,00
Rojo fenol -----	0,01
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -----	0,06
4.4. Aminácidos no esenciales	
L-Alanina -----	8,90
L-Asparagina $\cdot \text{H}_2\text{O}$ -----	15,00
Acido L-aspártico -----	13,30
Glicina -----	7,50
Acido glutámico -----	14,70
L-Prolina -----	11,50
L-Serina -----	10,50
4.5. Solución de $\text{NaHCO}_3$ al 1,4 % (isotónica)	
$\text{NaHCO}_3$ -----	7,0 g
$\text{H}_2\text{O}$ tridestilada, c.s.p. -----	500 ml

El medio de cultivo se esteriliza por filtración.

## II. CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSION

### A. Características de las células utilizadas.

#### A.1. Células CAE. (Figura 4).

Las células CAE proceden de células de cáncer ascítico de Ehrlich de ratón adaptadas en el Departamento al cultivo en suspensión "in vitro", en 1972. Para adaptarlas, se avenaron células CAE cultivadas "in vivo" mediante inoculación intraperitoneal de ratones. De la paracentesis de un animal se obtuvieron 7 ml con  $20 \cdot 10^6$  células/ml, se lavaron en solución salina fisiológica y se sembraron en tubos de 25 x 150 mm a una concentración de  $3 \cdot 10^5$  células/ml en medio esencial mínimo de Eagle suplementado con 20 % de suero de ternera, con un volumen total de 25 ml.

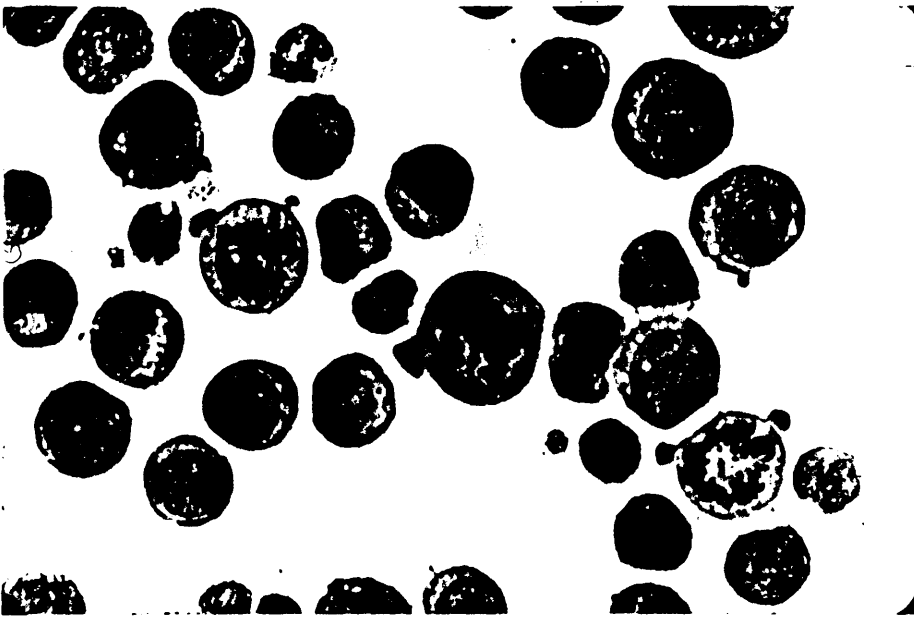
Algunos tubos progresaron y después de varios subcultivos se consiguieron adaptar a suspensión.

### B. Técnica de subcultivo.

Estas células, al estar en suspensión, se subcultivan sin necesidad de desprenderlas. Se realiza un recuento de la suspensión y se siembran nuevos tubos con 200.000 células/ml y 25 ml de volumen total, que se incuban en la estufa a 37°C colocados en un tambor giratorio a 55 revoluciones por minuto, para mantener las células en suspensión monodispersa.

Como medio de crecimiento se utilizó medio esencial mínimo de Eagle suplementado con 20 % de suero de ternera y 1 % de aminoácidos no

FIGURA 4 .



Preparación de células CAE procedentes del cáncer ascítico de Ehrlich de ratón, puede observarse la variedad de formas y tamaños de éstas células así como tres metafases anormales.



esenciales

### III. CULTIVO DE CELULAS IN VIVO

#### A. Características de las células utilizadas

##### A.1. Células CAEL.

Estas células son una variante de las CAE, que se mantienen por trasplantes intraperitoneales seriados en ratones de la cepa Swiss.

#### B. Técnica de trasplante.

El trasplante se realiza extrayendo del animal donador el líquido ascítico con las células que crecen en él, diluyendo la suspensión con NaCl 0,14 M para obtener  $1,5 \times 10^6$  células/ml e inoculando intraperitonealmente 150.000 células CAEL en 0,1 ml.

#### Solución de NaCl 0,14 M (solución salina fisiológica)

NaCl -----	8,18 g
H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	1000 ml

### IV. AISLAMIENTO DE LA MEMBRANA PLASMATICA

#### A. Técnica utilizada.

El procedimiento empleado para el aislamiento de membrana plasmática de las células es el descrito por T.K. Ray (1970) con algunas variantes que ha sido necesario introducir para adaptar el método a nuestras condiciones.

Este método consiste en la separación de los distintos componentes celulares por sus diferentes tamaños y densidades.

Esquemáticamente, el proceso consiste en: a) lavar las células para eliminar el medio de cultivo y la acción de sus componentes; b) someter a continuación las células a un choque hipotónico, que las hincha y facilita su rotura durante la homogeneización; c) separar los núcleos del resto de los componentes celulares por centrifugación diferencial a baja velocidad; los núcleos se recogen en la pella y el resto de los componentes celulares queda en el sobrenadante; d) separar los componentes solubles del citoplasma del resto, estructurales, mediante centrifugación diferencial a alta velocidad; en la pella se encuentran mitocondrias, fracción microsómica y membranas plasmática y del retículo endoplásmico y el sobrenadante será compuesto por el citosol; e) finalmente, los componentes de la pella del paso anterior se separan por centrifugación en gradiente de densidad, en el cual cada estructura emigra hasta alcanzar una zona en la que su densidad coincide con la de la zona. Así se consigue una pella que contiene las mitocondrias, y 4 bandas que corresponden, de abajo a arriba, a microsomas, membranas, lipoproteínas y lípidos.

La preparación de las soluciones a las que se hace referencia al describir la técnica se indica más adelante (IV. B).

#### A.1. Técnica para células cultivadas "in vitro".

1. De los cultivos en monocapa estacionaria se recogen las células lavando los frascos con solución salina citratada (SSC), raspando la monocapa con espátula para desprender las células y resuspendiéndolas en solución de Dulbecco. Si las células se cultivan en suspensión, se obtienen centrifugando a baja velocidad ( $90 \times g$ ) y resuspendiendo la pella en la solución mencionada.

2. Se transfieren las células a un tubo de centrífuga y se lavan con SSC utilizando un volumen 10 a 20 veces superior al de la pella celular. Se mide el volumen final y se toma alícuota para recuento celular.

3. Se centrifugan las células a 300 x g durante 15 minutos.

4. Se decanta y desprecia el sobrenadante y se mide el volumen de pella celular obtenido.

5. Se lava otras dos veces en las mismas condiciones, pero utilizando NaCl 0,14 M con Tris 20 mM a pH 7,4.

6. Se resuspende la pella en 1 volumen igual al de ella de solución hipotónica de  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{CaCl}_2$  suplementado con fluoruro de fenil-metil-sulfonil como inhibidor de enzimas proteolíticas.

7. A partir de este momento se trabaja a 4°C.

8. Se mantiene el producto a 4°C durante 2 horas para producir la rotura de las células por la hipotonicidad del medio.

9. Se procede a la homogeneización, en un homogeneizador de Potter de vidrio-teflón, girando a 3000 rpm durante 3 minutos y a 3500 rpm 1 minuto.

10. Se transfiere el homogenado a un tubo de centrífuga, se mide el volumen y se toma una alícuota para análisis cuantitativo de proteínas por el método de O.H. Lowry y cols. (1951), que se describe más adelante.

11. Se centrifuga a 300 x g durante 15 minutos.

12. Se recoge el sobrenadante, que contiene citoplasma y membrana, y se desprecia la pella, que está formada por los núcleos.

13. Se transfiere el sobrenadante a otro tubo de centrífuga, se mide el volumen y se toma una muestra para análisis cuantitativo de proteínas.

14. Se centrifuga a 14.000 x g durante 15 minutos.

15. Se recoge por separado el sobrenadante (citosol) y la pella (proteínas estructurales de citoplasma y membrana).

16. Se lava la pella con solución hipotónica de  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{CaCl}_2$ , centrifugando a continuación en las mismas condiciones del paso 14.

17. Se desprecia el sobrenadante y se resuspende la pella en un volumen de solución hipotónica de  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{CaCl}_2$  tal que el volumen final de la suspensión sea de 3,4 ml.

18. Se añaden 7,5 ml de sacarosa al 70 % (peso/volumen) y se toma alícuota para análisis cuantitativo de proteínas.

19. En un tubo de ultracentrífuga se forma un gradiente en bandas de sacarosa de 48 % a 37 %, con las siguientes cantidades, depositadas del fondo a la boca con cuidado para que no se mezclen:

10,9 ml de suspensión con las membranas en sacarosa al 48 %,

9,7 ml de sacarosa al 45 %,

12,0 ml de sacarosa al 41 % y

2,4 ml de sacarosa al 37 %.

20. Se centrifuga el producto a  $62.000 \times g$  durante 120 minutos.

21. Se recoge la banda que aparece en la interfase 45-41, correspondiente a la zona con una densidad 1,16 g/ml. Se mide el volumen y se toma una alícuota para análisis cuantitativo de proteínas.

22. Se lavan las membranas obtenidas con un volumen abundante de EDTA 1 mM, para eliminar los iones calcio y la sacarosa. Se centrifuga a  $24.000 \times g$  durante 30 minutos.

23. Se decanta y desprecia el sobrenadante y se congela la pella a  $-90^\circ\text{C}$  hasta su utilización, excepto si va a ser inmediata.

#### A.2. Técnica para células cultivadas "in vivo".

1. Se avenan los ratones inoculados intraperitonealmente con células CAEL.
2. Se registra el volumen de ascitis y se toma muestra para recuento celular.
3. Se transfiere a un tubo de centrifuga y se lava con solución de Dulbecco.
4. A partir de este momento se procede como en la técnica A.1., desde el punto 3.

#### A.3. Técnica para tejidos.

1. Los animales a sacrificar se dejan en ayunas desde el día anterior, para evitar pesos falsos debidos al exceso de glucógeno.
2. Se sacrifican los animales por fractura cervical.
3. Se extirpan los órganos necesarios.
4. Se colocan en placas de Petri taradas previamente y se pesan.
5. Se fragmentan las piezas con tijeras primero y después con bisturíes encarados.
6. Se transfieren los fragmentos a un tubo de centrifuga, se lavan con 10-20 volúmenes de solución salina de Dulbecco (respecto al peso).
7. Se centrifuga el material a 300 x g durante 5 minutos y se registra el volumen de pella.
8. Se lava otra vez en las mismas condiciones que en 6 y 7.
9. Se lava con 10 volúmenes de NaCl 0,14 M y tris 20 mM a pH 7,4.
10. Se centrifuga a 300 x g durante 5 minutos.
11. Se decanta y desprecia el sobrenadante y se lava la pella otras

dos veces como en 9 y 10.

12. Se resuspende la pella en 1 volumen (con respecto al peso original) de solución hipotónica de  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{CaCl}_2$ .

13. Se transfiere la suspensión a un homogeneizador de Potter vidrio-vidrio manual. Se dan 10 emboladas en baño de hielo ( $4^\circ\text{C}$ ).

14. Se transfiere el homogenado a un tubo de centrífuga, se mide el volumen y se toman alícuotas para recuento de núcleos y análisis cuantitativo de proteínas.

15. Se centrifuga a  $300 \times g$  durante 15 minutos.

16. Se decanta y guarda el sobrenadante a  $4^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

17. Se resuspende la pella en solución hipotónica y se procede a la homogeneización mecánica con un homogeneizador de Potter vidrio-teflón.

18. Se homogeneiza durante 90 segundos a 3.000 rpm.

19. Se transfiere a tubo de centrífuga y se centrifuga a  $300 \times g$  durante 15 minutos.

20. Se recoge el sobrenadante y se mancomuna con el obtenido en

16. Se desprecia la pella, que está formada por los núcleos.

21. Se registra el volumen total del mancomunado y se toma una muestra para análisis cuantitativo de proteínas.

22. Se transfiere a tubo de centrífuga y se centrifuga a  $14.000 \times g$  durante 15 minutos.

23. A partir de este momento se procede igual que en A.1., desde el punto 15.

B. Soluciones empleadas.1. SSC NaCl 0,15 M y  $C_6H_5Na_3O_7$  0,15 M)

NaCl -----	8,77 g
Citrato sódico $\cdot 2H_2O$ -----	44,15 g
$H_2O$ tridestilada, c.s.p. -----	1000 ml

2. Solución salina de Dulbecco

## 1ª Fracción:

NaCl -----	8,0 g
KCl -----	0,2 g
$Na_2HPO_4$ -----	1,15 g
$KH_2PO_4$ -----	0,2 g
$H_2O$ tridestilada, c.s.p. -----	400 ml

## 2ª Fracción:

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ -----	0,1252 g
$H_2O$ tridestilada, c.s.p. -----	200 ml

## 3ª Fracción:

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ -----	0,1 g
$H_2O$ tridestilada, c.s.p. -----	200 ml

Se esterilizan las fracciones por separado en el autoclave a  $115^\circ C$  durante 20 minutos. Se reúnen después las tres fracciones, se añaden 2 ml de rojo fenol al 1 % y se completa con agua tridestilada hasta 1000 ml. Se esteriliza por filtración a presión.

3. NaCl 0,14 M, Tris 20 mM, pH 7,4

NaCl -----	8,18 g
Tris -----	2,42 g
HCl 1N -----	12 ml
H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	1000 ml

Antes de enrasar se debe comprobar el pH.

Se esteriliza en autoclave a 115°C durante 20 minutos.

4. NaHCO<sub>3</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM fluoruro de fenil-metil-sulfonil

100 µM (solución hipotónica de NaHCO<sub>3</sub> y CaCl<sub>2</sub>)

NaHCO <sub>3</sub> -----	84 mg
CaCl <sub>2</sub> -----	294 mg
Fluoruro de fenil-metil-sulfonil -----	17,42 mg
H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	1000 ml

Se esteriliza por filtración.

5. EDTA 1 mM

EDTA (sal tetrasódica) -----	0,42 g
H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 115°C durante 20 minutos.

6. Sacarosa al 70 % (peso/volumen)

Sacarosa -----	70,0 g
Azida sódica (Na <sub>3</sub> N) -----	0,2 g
H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	100 ml

Se esteriliza en autoclave a 115° C durante 25 minutos.



7. Sacarosa al 45 % (peso/volumen)

Sacarosa -----	45,0 g
Azida sódica -----	0,2 g
H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	100 ml

Se esteriliza en autoclave a 115°C durante 25 minutos.

8. Sacarosa al 41 % (peso/volumen)

Sacarosa -----	41,0 g
Azida sódica -----	0,2 g
H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	100 ml

Se esteriliza en autoclave a 115°C durante 25 minutos.

9. Sacarosa al 37 % (peso/volumen)

Sacarosa -----	37,0 g
Azida sódica -----	0,2 g
H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	100 ml

10. HCl 1N

HCl 12N (37%) -----	41,2 ml
H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	500 ml

## V. SOLUBILIZACION DE LA MEMBRANA PLASMATICA

Para la solubilización de la membrana plasmática utilizamos la técnica de desintegración por ultrasonidos, que consiste en la ruptura al azar de los fragmentos de membrana que se han obtenido en el procedimiento anterior, debido al fenómeno de cavitación.

Cuando un líquido se somete a un sonido intenso, por encima de unos valores críticos (0,7 atmósferas en el caso del agua saturada de aire), el transporte de las ondas sonoras a través del líquido causa alteraciones bruscas de presión, lo que da lugar a la formación de muchas microburbujas que van creciendo hasta alcanzar un valor crítico, el cual depende de la frecuencia del sonido en el que se desintegran "implosivamente" produciendo altas temperaturas instantáneas y microcorrientes en el líquido que provocan la ruptura de las cadenas que forman las membranas.

#### A. Técnica utilizada.

1. Se descongela rápidamente la pella de membranas purificadas obtenida en el aislamiento de membranas A.1., punto 23.
2. Se resuspende en 6 a 7 ml de NaCl 0,14 M, Tris 20 mM fluoruro de fenil-metil-sulfonil 100  $\mu$ M y Tritón X-100 al 0,05 %.
3. Se transfiere la suspensión a un tubo de vidrio adaptable al desintegrador por ultrasonidos.
4. Se dan 6 ciclos de ultrasonidos de 30 segundos de duración en baño de hielo (4°C) distanciándolos el tiempo suficiente para que en ningún momento se caliente el material.
5. Se transfiere a tubo de centrifuga, se mide el volumen y se toma muestra para análisis cuantitativo de proteínas.
6. Se ultracentrifuga a 100.000 x g durante 60 minutos.
7. Se recoge el sobrenadante y se guarda como antígenos solubilizados, registrando el volumen y tomando muestra para análisis cuantitativo de proteínas.

8. Se resuspende la pella como en 2 y se repiten los puntos 3, 4, 5, 6 y 7.

9. Se resuspende la pella como en 2 y se repite el proceso como en 3, 4, 5, 6 y 7.

10. Se desprecia la pella final.

**B. Disoluciones empleadas.**

1. NaCl 0,14 M, Tris 20 mM, fluoruro de fenil-metil-sulfonil 100  $\mu$ M y Triton X-100 al 0,05 %, pH 7,4.

NaCl -----	8,18 g
Tris -----	2,42 g
Fluoruro de fenil-metil-sulfonil -----	0,017 g
Triton X-100 -----	0,5 ml
HCl 1N -----	12,0 ml
H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	1000 ml

Se esteriliza por filtración.

En este procedimiento se utiliza un desintegrador por ultrasonidos PG 100, modelo 150W, de la casa MSE y una sonda de titanio con forma cónica y un diámetro inferior de 3 mm.

**VI. INMUNIZACION DE CONEJOS**

La inmunización de un animal tiene por objeto la obtención de anticuerpos contra un determinado antígeno. El método consiste en la administración de dosis determinadas del antígeno para provocar en el animal una respuesta

inmunológica contra este antígeno.

La quimerización se basa en el hecho de la tolerancia inmunológica que se adquiere cuando los antígenos extraños se administran antes de que haya respuesta inmunológica. Así, si se inocula un animal recién nacido con un antígeno, el animal aún no ha desarrollado su sistema inmunológico, y por tanto no reconoce como extraños esos antígenos cuando alcanza la madurez inmunológica. Posteriormente, cuando el animal llega a adulto, la administración de ese antígeno no provocará ninguna respuesta inmunológica. Si ese antígeno va mezclado con otros, el sistema inmunológico del animal es capaz de discernir entre el que tolera en su carácter de quimera inmunológica y el que no, elaborando anticuerpos únicamente contra los restantes antígenos.

En el caso que nos ocupa, se quimerizaron conejos inyectando antígenos procedentes de células de ratón normal en la fase sin respuesta inmunológica y posteriormente, cuando los animales alcanzaron la madurez inmunológica recibieron membranas solubilizadas de células cancerosas de ratón, frente a las cuales el animal no reaccionará contra la gran cantidad de antígenos normales que tenga tanto la célula cancerosa como la normal, elaborando selectivamente anticuerpos contra aquellos antígenos que sean propios de la transformación neoplásica, sean oncoasociados u oncoespecíficos.

La pauta seguida para la inmunización simple y la inmunización de conejos quimera inmunológica se describe a continuación.

#### A. Técnica de inmunización simple.

Se sangra al conejo antes de la inmunización para disponer de suero control. Se le da una primera dosis de 200 µg del antígeno o mezcla

de antígenos por vía intravenosa. A los 10 días se da la segunda dosis, en este caso de 2 mg de antígenos mezclados con coadyuvante de Freund completo para potenciar la respuesta, que se pone repartida en 5 inyecciones, una en cada pata y otra en la zona interescapular; 10 días más tarde se da la tercera dosis; que es exactamente igual a la segunda; y 10 días después de la dosis anterior, a los 30 días de iniciada la inmunización, se da la última dosis, una dosis de recuerdo de 200  $\mu$ g por vía intravenosa.

**B. Técnica de inmunización en conejos quimera inmunológica.**

Para la quimerización se utilizó el método descrito por Y. Alvarez-Rodríguez y cols. (1979). Se inoculan conejos recién nacidos de 40 a 50 g de peso con 3 mg de antígenos normales frescos de membrana plasmática de hígado, bazo y útero de ratones adultos, inyectados por vía subcutánea para provocar la otolerancia inmunológica a estos antígenos. Cuando el conejo es adulto, a partir de los 7 meses, se sangra a los conejos para disponer de suero control y se inyectan antígenos de células cancerosas por la técnica descrita en el apartado A.

A los 30 días el conejo recibe la última dosis antigénica y a partir de una semana más tarde se puede extraer el inmunosuero.

**VII. OBTENCION DE INMUNOSUEROS**

**A. Técnica.**

Sangrado del conejo.

Se afeita la oreja del conejo en la zona de la vena marginal, se lava con alcohol de 70°, se seca y se pone sobre la superficie unas gotas de xilol para provocar la vasodilatación, se deja actuar unos 15 segundos y se seca con un algodón estéril. Con un bisturí estéril se hace un corte longi-

tudinal de la vena marginal de la oreja, en la parte próxima al extremo de ésta. Se recoge la sangre dejándola escurrir en tubos estériles.

Recogida del suero sanguíneo.

La sangre obtenida se incuba a 37°C durante 20 minutos. Se desprende después el coágulo con un golpe seco. Se guarda a 4°C durante 24 horas para que el coágulo se retraiga. Al día siguiente se recoge el suero, se centrifuga a 200 x g durante 15 minutos y se desprece la pella formada. Se esteriliza por filtración. Se guarda a -90°C hasta su utilización.

#### VIII. AISLAMIENTO DE INMUNOGLOBULINAS POR CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN RECICLO ASCENDENTE

El procedimiento empleado para el aislamiento de inmunoglobulinas fue la cromatografía de filtración por gel de dextrano (H. Determann, 1968; L. Fisher, 1976; Pharmacia Fine Chemicals, 1979a).

Esta técnica consiste en la separación de las distintas moléculas que componen una mezcla en función de su tamaño, utilizando un gel poroso.

Las partículas del gel forman una malla; en el proceso se crea un equilibrio entre la fase líquida existente alrededor de las partículas de gel y la fase del gel propiamente dicho.

Dependiendo del tamaño del poro del gel utilizado, las moléculas pueden difundir desde la fase líquida a la fase del gel.

Las moléculas grandes, por encima del límite de exclusión del gel, no penetran dentro de las microesferas y avanzan y salen rápidamente de la columna, mientras que las moléculas pequeñas penetran en las microesferas a

diferentes profundidades según su tamaño y configuración, tanto más cuanto menor sea su tamaño, saliendo por tanto más tarde; es decir, que las moléculas van saliendo en razón inversa a su tamaño.

El soporte debe cumplir los siguientes requisitos:

- ser un polímero iónico pero no ionizable,
- ser hidrófilo pero insoluble en agua,
- presentar estabilidad de tipo mecánico.

Dependiendo del tamaño de las moléculas que queramos separar es necesario elegir el gel que tenga el tamaño de poro correcto para que se lleve a cabo la tamización molecular.

En cromatografía de filtración en gel hay que tener en cuenta los siguientes parámetros:

- volumen de exclusión,  $V_o$ : volumen que rodea a las microesferas, ocupado por moléculas grandes,
- volumen de inclusión,  $V_i$ : volumen interior entre las microesferas, ocupado por moléculas pequeñas (del eluyente),
- volumen total del lecho,  $V_t$ : suma de los volúmenes de exclusión e inclusión,
- volumen de elución,  $V_e$ : ocupado por las moléculas de tamaño intermedio, que penetran en las microesferas, aunque con menor libertad que el eluyente.  $V_e$  está comprendido entre  $V_o$  y  $V_t$  (L. Hudson y F.C. Hay, 1978).

En cromatografía de filtración en gel la capacidad de la columna para la muestra a ofertar debe ser como máximo del 3 a 4 % del volumen total de lecho. La muestra se prepara diluyéndola de 3 a 6 veces con respecto a la concentración original.

Para nuestro experimento hemos utilizado Sephadex G-150 superfino, que es un polímero de dextrano entrelazado con epiclorohidrina, que forma un retículo tridimensional de cadenas de polisacáridos, los cuales se hinchan en contacto con el agua debido a su alto contenido en grupos hidroxílicos. El tiempo y la temperatura a que se produce el hinchamiento del gel depende del grado de entrecruzamiento ("cross-linking") del dextrano en nuestro caso, a 100°C se necesitan 5 horas y a temperatura ambiente 3 días.

Las características de la resina son:

- tamaño de partícula: 10-40  $\mu$ m de diámetro en el producto seco,
- campo de fraccionamiento: 5.000 - 150.000 D para proteínas,
- límite de exclusión: 150.000 D,
- volumen de lecho/gramo: 18-22 ml.

Es estable a pH comprendidos entre 2 y 10 y a agentes disociantes como la urea, cloruro de guanidina y dodecilsulfato sódico. Se debe evitar el uso de agentes oxidantes fuertes.

Se regenera por lavado.

Para el aislamiento de inmunoglobulinas utilizamos cromatografía ascendente con reciclo. Utilizamos flujo inverso (contra la gravedad) porque tiene la ventaja de impedir el apelmazamiento del gel y por tanto permite el flujo libre del eluyente (J. Vaage y S. Agarwal, 1978).

La velocidad de flujo varía según el diámetro de la columna y la presión. Para una columna de 2,5 cm de diámetro, que es la utilizada, el flujo máximo es de 0,14 ml/minuto para una presión de 9 a 36 cm de agua.



#### A. Técnica.

##### Preparación del lecho.

Se pesa la cantidad necesaria de gel, según el volumen de lecho que se desee, se transfiere a un matraz de Erlenmeyer y se añade un volumen de buffer fosfato aproximadamente doble del volumen de lecho. Se coloca al baño maría durante 5 horas, se deja enfriar y se introduce en la columna. Después se lava con dos volúmenes de buffer fosfato y hasta su utilización se mantiene a 10°C en buffer fosfato suplementado con azida sódica al 0,1 % para evitar contaminaciones bacterianas. Las cantidades concretas de gel y buffer utilizadas en nuestros experimentos se indican al hablar de "Resultados".

##### Preparación de la muestra.

a) Inactivación de la muestra: se realiza manteniendo el suero sanguíneo a 56°C durante 30 minutos.

b) Concentración de la muestra: se coloca el suero en una membrana Centriflo CF 50, se centrifuga a 1,280 x g durante 30 minutos y se recoge el líquido que queda en la parte superior.

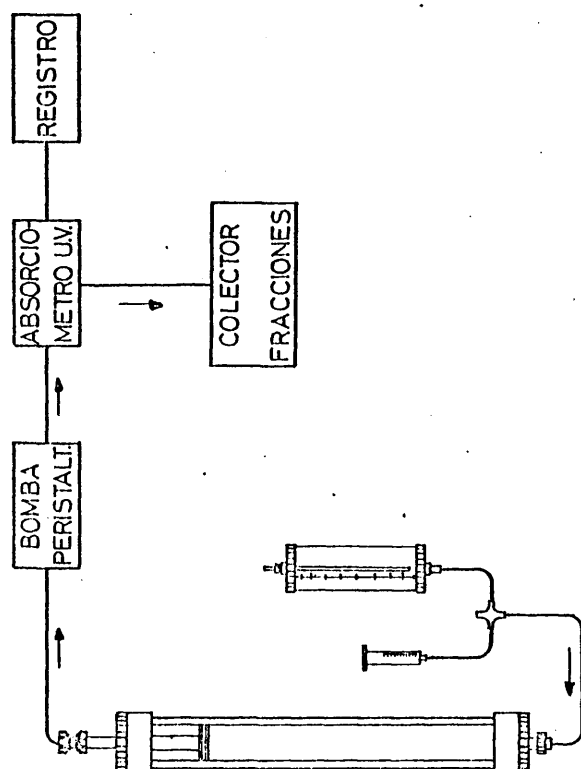
c) Diálisis de la muestra: se lava con buffer fosfato tres veces como mínimo con el mismo dispositivo de la concentración, centrifugando a 1.280 x g durante 30 minutos cada vez.

##### Introducción de la muestra.

Una vez eliminado el azida sódica de la columna, se introduce la muestra según la figura 5. La muestra se coloca en la jeringa que está conectada a la parte inferior de la columna mediante una válvula de 3 vías, el buffer de arrastre se coloca en un recipiente también conectado a dicha

FIGURA 5

ESQUEMA DEL MONTAJE DE LA CROMATOGRAFIA  
DE FILTRACION POR GELES EN RECICLO ASCENDENTE



Se introduce la muestra con una jeringa conectada a la parte inferior de la columna mediante una válvula de 3 vías; inmediatamente después se arrastra con buffer. La salida de la columna (parte superior) está conectada a una bomba peristáltica que manda el líquido a un absorciómetro ultravioleta y de ahí a un colector de fracciones. La densidad óptica queda reflejada en el registro.

válvula. La salida de la columna está conectada a una bomba peristáltica para mantener el flujo constante; el líquido, después de pasar por la columna, pasa por la celdilla de un absorciómetro que registra gráficamente la densidad óptica en cada momento y de ahí pasa a ser recogido mediante un colector de fracciones que se puede regular en tiempos o volúmenes.

#### Recogida de las inmunoglobulinas.

Una vez realizada la cromatografía se recogen las fracciones que contienen las inmunoglobulinas. En el primer paso éstas se encuentran en los dos primeros picos, que salen solapados. Se mancomunan, se concentran y se vuelven a pasar por la columna. En el segundo paso, el tercer pico es mucho más pequeño y se recogen otra vez los dos primeros, que salen solapados. Se repite el proceso y en la tercera pasada se vuelven a recoger los dos primeros picos eliminando también la pequeña parte que corresponde al tercer pico.

#### B. Disoluciones empleadas.

##### 1. Buffer fosfato 0,05 M en NaCl 0,1 M

###### Solución A:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -----	14,196 g
$\text{H}_2\text{O}$ tridestilada, c.s.p. -----	1000 ml

###### Solución B:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -----	15,601 g
$\text{H}_2\text{O}$ tridestilada, c.s.p. -----	1000 ml

## Solución C:

NaCl -----	11,69 g	
H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	1000	ml
Buffer:		
Solución A -----	580	ml
Solución B -----	420	ml
Solución C -----	1000	ml

Una vez mezcladas las 3 disoluciones se mide el pH, que tiene que ser 6,9.

2. Buffer fosfato 0,05 M en ClNa 0,1 M y 0,1 % de azida sódica

Buffer fosfato -----	1000	ml
Azida sódica -----	1	g

## IX. AISLAMIENTO DE ANTIGENOS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

La cromatografía de afinidad consiste en la inmovilización de una molécula bioespecífica por conjugación a una matriz insoluble seguida de la adición de la mezcla de sustancias en la que se encuentra la que queremos separar. La molécula fijada es entonces capaz de absorber de la solución la sustancia a aislar, mientras que las demás pasan sin reaccionar, al cambiar las condiciones experimentales la sustancia deseada vuelve a quedar libre (Pharmacia Fine Chemicals, 1979b; Hoffmann-Ostenhof y cols., 1977).

La matriz debe ser física, química y térmicamente estable, tener buenas propiedades de flujo y estar libre de absorciones no específicas.

La matriz elegida para nuestros experimentos fue la Sepharosa 4B acti-

vada con CNBr, que es capaz de conjugar proteínas y otras moléculas que contengan grupos amino primarios.

La Sepharosa es un polímero formado por bolas de agarosa en forma de rosario (D-galactosa y 3,6,anhidro-galactosa). La Sepharosa 4B tiene una absorción no específica extremadamente baja; para que se conjugue con proteínas es necesario activarla con CNBr (bromuro de cianógeno), el cual reacciona con los grupos hidroxílicos de la Sepharosa convirtiéndolos en grupos imida, que reaccionan con los grupos nucleofílicos. La Sepharosa activada reacciona con los grupos amino primarios del ligando para formar isoureas.

#### A. Técnica.

##### A.1. Preparación del lecho.

1. Se pesa la cantidad necesaria de Sepharosa 4B activada con CNBr según el volumen de lecho deseado y se transfiere a un embudo de placa de vidrio de 7 µm de diámetro. La cantidad utilizada en cada caso se indica en el capítulo de "Resultados".

2. Se lava durante 15 minutos con HCl 0,001 M para que se hinche el grano. El volumen de lavado debe ser como mínimo 200 ml/g de gel seco.

3. Se lava con buffer  $\text{NaHCO}_3$  0,1 pH 8 para que el pH del gel sea básico antes de la conjugación con las proteínas.

4. Se transfiere a un tubo.

5. Al tubo que contiene la Sepharosa se añaden las proteínas a conjugar, también a pH 8 y a una concentración de 10-20 mg/ml.

6. Se agita durante 2 horas a temperatura ambiente (haciéndolo

oscilar en posición horizontal).

7. Se transfiere al embudo de placa de vidrio y se lava con buffer  $\text{NaHCO}_3$  recogiendo el líquido de salida para análisis cuantitativo de las proteínas que salen, las cuales corresponden a las proteínas que no se han fijado a la Sepharosa.

8. Se transfiere a un tubo y se añaden 3 volúmenes de etanolamina 1 M con respecto al volumen del lecho.

9. Se agita durante 2 horas como en el punto 8 para agotar los centros activos que no hayan reaccionado con las proteínas.

10. Se transfiere a una columna de Pharmacia Fine Chemicals modelo K9/15. Se recoge el líquido de salida para análisis de proteínas. Fig. 6.

11. Se lava el lecho con 4 volúmenes de buffer borato 0,1 M pH 8, recogiendo el líquido de salida para análisis cuantitativo de proteínas.

12. Se lava con 4 volúmenes de buffer acetato 0,1 M pH 4, recogiendo el líquido de salida para análisis de proteínas.

13. Se continúan los lavados para estabilizar la columna hasta que los cambios de pH sean mínimos, recogiendo siempre el líquido de salida para después calcular el total de proteínas que no se han fijado y calcular el rendimiento de conjugación.

14. Se guarda hasta su utilización en buffer Tris pH 7,4 con 0,1 % de azida sódica para evitar contaminaciones.

#### A.2. Oferta de la mezcla de antígenos.

1. Se introduce la muestra en un recipiente conectado a la parte superior de la columna.

2. Se conecta la salida de la columna a una bomba peristáltica

FIGURA 6  
ESQUEMA DEL MONTAJE DE LA CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

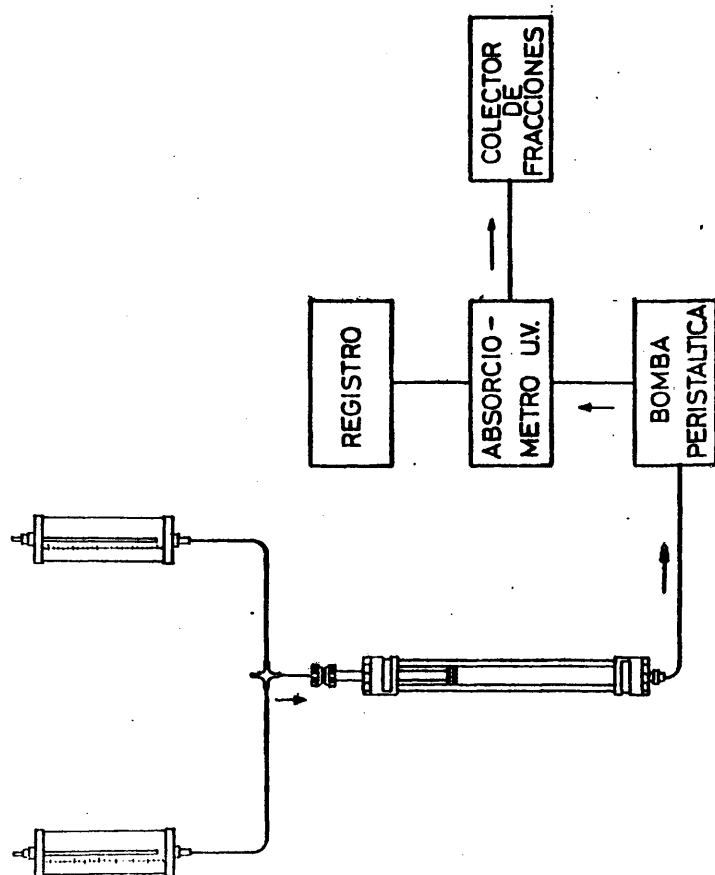


FIGURA 6

## ESQUEMA DEL MONTAJE DE LA CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

Se introduce la oferta por la parte superior de la columna, se lava con buffer NaCl 0,14 M Tris 20 mM, pH 7,4 y se elide con buffer glicina-HCl 0,2 M pH 2,8. Cada uno de los buffers está en un recipiente y su entrada a la columna se regula por una válvula de 3 vías.

La salida de la columna está conectada a una bomba peristáltica que lleva la muestra al colector de fracciones después de pasar por el absorciómetro ultravioleta que registra la densidad óptica a 275 nm.



que a su vez está conectada a un absorciómetro para controlar la salida de las proteínas y a un colector para recoger las muestras.

3. Se mantiene la oferta en reciclo durante 2 horas.

4. Se lava con buffer Tris pH 7,4 hasta que el absorciómetro no detecte salida de proteínas.

5. Se eliden las proteínas específicamente fijadas con buffer glicina pH 2,8.

6. Se recogen las muestras en Tris (100 mg/ml), en proporción 0,1 ml/ml de eluato para cambiar a pH neutro o ligeramente básico, con objeto de que las proteínas estén el menor tiempo posible a pH ácido, lo que produce desnaturalización.

7. Se vuelve a elidir con buffer glicina pH 2,8 conteniendo 10 % de dioxán, para rescatar las proteínas (antígenos) unidas más fuertemente a las proteínas (anticuerpos) fijadas a Sepharosa. En este caso también se recogen las fracciones sobre Tris (100 mg/ml) para evitar la desnaturalización.

#### B. Disoluciones empleadas.

##### 1. HCl 0,001 M

HCl 1 N-----	1	ml
H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	1000	ml

##### 2. NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M en NaCl 0,5 M pH 8

NaHCO <sub>3</sub> -----	8,4	g
NaCl 0,5 M, c.s.p. -----	1000	ml

3. NaCl 0,5 M

NaCl -----	29,25	g
H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	1000	ml

4. Etanolamina 1 M

Etanolamina -----	6,1	ml
HCl -----	8,0	ml
Tris-HCl pH 8 c.s.p. -----	100	ml

Se guarda en frasco topacio y en la oscuridad.

5. Tris-HCl 0,2 M en NaCl 0,5 M pH 8

Tris(hidroximetil)aminoetano -----	12.114	g
HCl 1 N -----	50	ml
NaCl 0,5 M c.s.p. -----	500	ml

6. Tris-HCl 0,02 M en NaCl 0,14 M pH 7,4

Indicada en el apartado IV-B

7. Glicina 0,2 M en NaCl 0,5 M pH 2,8

Glicina -----	7,5	g
HCl 1 N -----	20,0	ml
NaCl 0,5 M, c.s.p. -----	500	ml

8. Buffer acetato 0,1 M en NaCl 1 M pH 4

C <sub>2</sub> O <sub>2</sub> H <sub>3</sub> Na·3H <sub>2</sub> O -----	13,6	g
H <sub>4</sub> C <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -----	5,8	ml
NaCl 1 M, c.s.p. -----	1000	ml

9. NaCl 1 M

NaCl -----	58,44	g
H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	1000	ml

10. Buffer borato 0,1 M en NaCl 1 M pH 8

$H_3BO_3$ -----	6,18	g
$Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ -----	38,14	g
NaCl 1 M c.s.p. -----	1000	ml

11. Tris, 100 mg/ml

Tris(hidroximetil)aminometano -----	10,0	g
$H_2O$ tridestilada, c.s.p. -----	100	ml

## X. VALORACION DE PROTEINAS

Las proteínas se valoraron por el método de O.H. Lowry y cols. (1951).

Esta técnica consiste en hacer reaccionar las proteínas con unos reactivos que producen una coloración azul proporcional a la concentración de proteínas en la muestra.

El color final es el resultado de la reacción del biuret, que consiste en la formación de complejos entre las sustancias que contienen más de un enlace peptídico y las sales de cobre en medio alcalino, así como la reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico por la tirosina y el triptófano presentes en las proteínas tratadas.

A. Técnica de análisis.

## 1. Curva patrón.

Se construye una curva patrón procediendo de la siguiente manera.

Se toman alícuotas de la disolución de seralbumina patrón comprendidas entre 10  $\mu$ g (0,05 ml) y 100  $\mu$ g (0,5 ml). Se añade  $H_2O$  bidestilada

hasta completar un volumen de 0,6 ml, se agita. Se añaden 3 ml del reactivo C. Se deja en reposo 10 minutos. Se añaden 0,3 ml del reactivo E. Se agita mecánicamente. Se espera 1 hora para que tenga lugar la reacción. Se lee la densidad óptica de cada tubo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm.

Se hace una representación gráfica en la que figura la cantidad de proteínas en  $\mu\text{g}$  en el eje de las abscisas y la densidad óptica en el eje de las ordenadas.

## 2. Valoración de una solución problema de proteínas.

Se toman alícuotas de la solución problema. Se completa hasta 0,6 ml con  $\text{H}_2\text{O}$  o  $\text{NaOH}$  0,5 N, según esté la solución problema original en  $\text{H}_2\text{O}$  o en  $\text{NaOH}$  0,5 N. Se añaden 3 ml del reactivo C o D, según esté la solución en  $\text{H}_2\text{O}$  o en  $\text{NaOH}$  0,5 N. Se agita. Se esperan 10 minutos. Se añaden 0,3 ml del reactivo E. Se lee la densidad óptica en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm después de 1 hora. Se llevan los valores de densidad óptica a la curva patrón y se extrapolan las cantidades de proteína que producen esa absorbancia.

## B. Disoluciones empleadas.

Reactivo A ( $\text{NaOH}$  0,1 N)

$\text{Na}_2\text{CO}_3$ anhidro -----	2,0 g
$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (tartrato de sodio y potasio) -----	0,2 g
$\text{NaOH}$ 0,1 N, c.s.p. -----	100 ml

Reactivo A (H<sub>2</sub>O)

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> anhidro -----	2,0	g
NaKC <sub>4</sub> O <sub>6</sub> H <sub>2</sub> (tartrato de sódio y potasio) -----	0,2	g
H <sub>2</sub> O, c.s.p. -----	100	ml

## Reactivo B

CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O -----	0,50	g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -----	1	gota
H <sub>2</sub> O bidestilada, c.s.p. -----	100	ml

## Reactivo C

Reactivo A (NaOH 0,1 N) -----	50	ml
Reactivo B -----	1,0	ml

## Reactivo D

Reactivo A (H <sub>2</sub> O) -----	50	ml
Reactivo B -----	1,0	ml

## Reactivo E

Reactivo de Folin-Ciocalteu -----	5,0	ml
H <sub>2</sub> O bidestilada -----	4,7	ml

## Disolución patrón de seralbúmina con 200 µg/ml

Seralbúmina bovina -----	0,10	g
H <sub>2</sub> O bidestilada c.s.p. -----	500	ml

Esterilizar por filtración.

## NaOH 0,5 N

NaOH -----	20,0	g
H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	1000	ml

## XI. INMUNODIFUSION

Esta técnica se basa en la reacción de precipitación antígeno-anticuerpo, que fue descrita por primera vez por Kraus en 1897. A lo largo de este siglo se fueron introduciendo modificaciones para mejorar la reacción hasta llegar a las técnicas de precipitación por difusión en un medio semisólido. La técnica que nosotros empleamos es la de doble inmunodifusión de Duchterlony (1948) (A.J. Crowle, 1973).

La doble inmunodifusión de Duchterlony consiste en preparar una placa con un medio semisólido, perforar en ella unos pocillos periféricos y otro central y colocar en la serie periférica los antígenos y en el central los anticuerpos o al contrario, dejarlos difundir un tiempo en atmósfera de humedad y revelarlos.

## A. Técnica.

1. Se coloca una placa de Petri de 4 cm de diámetro sobre una mesa horizontal.
2. Se depositan en ella 2,5 ml de agar o agarosa al 1 % "tamponado" a 60°C, procurando que no se formen burbujas.
3. Se deja solidificar y se guarda a 4°C durante 2 horas.
4. Se perforan en el agar 7 pocillos de 5 mm de diámetro: uno central y 6 periféricos equidistantes del central.
5. Se colocan en los pocillos los antígenos y anticuerpos según cada esquema determinado, como se indica en "Resultados".
6. Se guarda la placa a temperatura ambiente en un recipiente

saturado de humedad durante 24 a 48 horas.

7. Cuando aparecen las bandas se procede a su lavado y tinción.

Lavado de la placa.

1. Se lava la placa con NaCl 0,14 M, agitando un poco y decantando con cuidado 2 veces.

2. Se cubre la placa con NaCl 0,14 M y se deja 30 minutos, después de los cuales se decanta y se repite este lavado 4-5 veces.

3. Se deja la placa cubierta con la solución salina durante toda la noche.

4. Al día siguiente se decanta, se añade otra vez NaCl 0,14 M y se deja durante 2 horas, al cabo de las cuales se repite el lavado de 2 horas.

5. Se lava 3-4 veces durante 10 minutos con agua destilada.

6. Después del último lavado se seca la placa y los pocillos con un papel filtro y se conserva en la estufa a 37°C hasta el día siguiente.

7. Se procede a la tinción.

Tinción de la placa

1. Se echan en la placa 5 ml de negro de amido al 0,05 %.

2. Se deja actuar durante 5 minutos.

3. Se decanta y se lava con solución de metanol:ácido acético: agua (4:1:5) hasta que no se desprenda color.

4. Se lava 3 veces con agua destilada.

5. Se deja secar al aire.

B. Disoluciones empleadas.

## 1. Agar al 1 % o agarosa al 1 % "tamponados"

## Fracción 1

Agar o agarosa -----	10,0 g
----------------------	--------

Azida sódica -----	1,0 g
--------------------	-------

H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	500 ml
---	--------

## Fracción 2

Acetato de barbitona -----	16,5 g
----------------------------	--------

H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	500 ml
---	--------

Ambas fracciones se preparan por separado, se calientan y se mezclan. Se reparte en alícuotas de 20 ml y se esterilizan en autoclave a 115°C durante 20 minutos.

## 2. NaCl 0,14 M

NaCl -----	8,18 g
------------	--------

H <sub>2</sub> O, c.s.p. -----	1000 ml
--------------------------------	---------

## 3. Metanol:ácido acético:agua 4:1:5

Metanol -----	400 ml
---------------	--------

Acido acético -----	100 ml
---------------------	--------

H <sub>2</sub> O tridestilada -----	500 ml
-------------------------------------	--------

## 4. Negro de amido 0,05 %

Negro de amido -----	0,25 g
----------------------	--------

Metanol:ácido acético:agua, c.s.p. -----	500 ml
--	--------



## XII. INMUNOELECTROFORESIS

Este método fue introducido en 1953 por P. Grabar y C.A. Williams. Es la suma de dos técnicas: electroforesis seguida de inmunodifusión (P.G. Grabar y P. Burtin, 1964).

Esta técnica se utiliza para la identificación de una mezcla de antígenos gracias a su diferente movilidad electroforética, cuando dicha mezcla se somete a un campo eléctrico. A continuación, mediante la inmunodifusión, podemos identificar las bandas por reacción de precipitación específica con anticuerpos.

A. Técnica.

1. Se funden unos 60 ml de agar o agarosa al 1 % "tamponados".
2. La placa de preparación para electroforesis se nivela sobre una mesa.
3. Se colocan 8 portaobjetos perfectamente limpios sobre la placa.
4. Se echa el agar a 58°C.
5. Se quita el exceso de agar con una regla niveladora.
6. Se deja solidificar y se guarda 1 hora a 4°C.
7. Utilizando el instrumento al efecto se hacen 2 ranuras y 3 pocillos en cada portaobjetos.
8. Se colocan las muestras en los pocillos.
9. Se coloca la placa en el baño electroforético, en el que previamente se ha puesto el electrolito a 40-50°C para crear una atmósfera de

humedad.

10. Se hace el contacto entre el electrolito y la placa mediante papeles Whatman grado n° 3mm.

11. Se conectan los polos a la fuente de alimentación eléctrica.

12. Para controlar el recorrido electroforético se colocan en el extremo de la placa unos granitos de azul de bromocresol; cuando éste se empieza a salir de la placa, la electroforesis se puede cortar.

Las condiciones de la electroforesis son:

- Voltaje ----- 100 V

- Intensidad ----- 35 mA

- Tiempo ----- 90 minutos

13. Una vez terminada la electroforesis se retira la placa del baño y se echa el antisuero correspondiente en las ranuras.

14. Se guarda en atmósfera de humedad a temperatura ambiente durante 24-48 horas, hasta que se visualice la reacción de precipitación.

15. Se corta el agar siguiendo los bordes de los portaobjetos y se procede a su lavado y tinción de la manera descrita para las placas de inmunodifusión en el método XI.

#### B. Disoluciones empleadas.

1. Agar o agarosa 1 % "tamponada"

Descrita en método XI.

2. Buffer de Owen (electrolito de la electroforesis)

Acetato de barbitona ----- 16,5 g

H<sub>2</sub>O tridestilada, c.s.p. ----- 1000 ml

## XIII. MICROMETODO PARA TITULACION DE CITOTOXICIDAD

A. Técnica de titulación de citotoxicidad de los antisueros.

Utilizamos esta técnica para calcular el título citotóxico de los antisueros, así como la inhibición que produce la previa incubación de dichos antisueros con los antígenos de membrana.

El procedimiento se lleva a cabo de la siguiente manera.

Se desperdigan las células de los cultivos de tejidos (en nuestro caso células de la línea EREA). Se realiza un recuento del número de células con una cámara hemocitométrica de Neubauer y se hace la dilución necesaria con el medio de cultivo habitual para obtener una suspensión con 50.000 células/ml. En cada pocillo de la placa de microtitulación se ponen 10 µl de suspensión celular, que contienen 500 células. Se coloca la placa en un recipiente en atmósfera de 93 % de humedad relativa y aire con 5 % de anhídrido carbónico. Se incuba la placa en una estufa a 37°C. Al día siguiente, con las células ya adheridas en el fondo de los pocillos, se lavan con medio de cultivo base y se añade el antisuero a titular en diluciones crecientes de factor 2 en medio base. Se incuban durante 1 hora a 37°C y se realiza la lectura de viabilidad celular por exclusión de colorante y citomorfología. Aquel punto correspondiente a la última dilución que produzca la muerte del 100 % de las células se tomará como título del antisuero.

En el caso de células CAEL, se procede de la siguiente manera. Se extrae la suspensión celular que crece intraperitonealmente en el ratón me-

diente paracentesis, se lava la suspensión celular con NaCl 0,14 M, se resuspenden las células en medio base y se realiza un recuento celular. Se prepara una suspensión con 50.000 células/ml y se ponen 10 µl en cada pocillo. Inmediatamente después se añaden las diluciones correspondientes de antisuero, se incuba 1 hora a 37°C y se realiza el recuento de viabilidad celular. La incubación se hace en atmósfera de aire con 5 % de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa de 93 %.

B. Técnica de titulación de inhibición de citotoxicidad de los antisueros previamente absorbidos con antígenos.

El procedimiento es fundamentalmente el mismo, pero antes de añadir el antisuero a los pocillos, éste se incuba 1 hora 30 minutos con diluciones crecientes de factor 2 de los antígenos de membrana. A continuación se valora la inhibición de la citotoxicidad que ha producido la absorción previa con los antígenos.

#### XIV. PRUEBA DEL ANILLO

Esta prueba sirve para saber si los anticuerpos creados contra uno o varios antígenos determinados son o no precipitinas. La técnica se basa en la reacción de precipitación antígeno-anticuerpo. Esta reacción fue descrita por primera vez por Kraus en 1897. El test de precipitación en anillo fue introducido por Ascoli en 1902. La forma de realizar dicha prueba ha sido descrita por R.R.A. Coombs y P.G.H. Gell (1968) y otros autores.

#### A. Técnica.

Se coloca 0,1 ml de antisuero en un tubito sin reborde, se añade lentamente para que no se mezcle 0,1 ml de la solución del antígeno a una concentración de 10 a 20 mg/ml. Se espera 1 a 2 minutos, en el transcurso de los cuales se forma un anillo de precipitado en la interfase entre el antígeno y el antisuero. Si pasado este tiempo no se forma el anillo, es que el antisuero no contiene precipitinas.

### XV. CURVA DE PRECIPITACION CUANTITATIVA

Esta prueba, desarrollada por M. Heidelberg y F.E. Kendall (1935a, b), es la base de todos los estudios cuantitativos de la interacción antígeno-anticuerpo (E.A. Kabat y M.M. Mayer, 1948).

La técnica consiste en poner cantidades crecientes de antígeno en presencia de una cantidad fija de anticuerpo, incubar para que se forme un precipitado, valorar ese precipitado y de ahí sacar la equivalencia o relaciones óptimas en las que hay que poner el antígeno y el anticuerpo para que la reacción de precipitación sea máxima.

#### A. Técnica.

Se preparan 10 tubos de centrífuga con cantidades crecientes de antígeno en un volumen constante (0,5 ml). Se añade a todos los tubos 0,5 ml de una dilución constante de antisuero y se mezclan los reactivos. Se incuban durante 1 hora a 37°C. Se guardan hasta el día siguiente a 4°C. Se centrifugan a 3000 x g durante 15 minutos. Se extrae el sobrenadante, se

lava la pella de precipitado y se determina en ella la cantidad de proteínas.

Se representa gráficamente la cantidad de precipitado frente a la cantidad de antígeno en cada punto. El punto inmediatamente anterior al máximo es el punto de equivalencia.

En el punto de equivalencia se calcula la cantidad de anticuerpo que ha reaccionado, por diferencia entre el peso del precipitado y el peso del antígeno. El valor obtenido corresponde a la cantidad de inmunoglobulinas específicas activas que contiene el suero.

#### XVI. INMUNOGENICIDAD

Esta técnica consiste en administrar sustancias antigénicas celulares o subcelulares en varias dosis a grupos de ratones, e inocular posteriormente células cancerosas vivas evaluando la aparición o no de tumores y, en el primer caso, si progresa o regresa después de un tiempo de evolución.

##### A. Técnica.

1. Se forman grupos de 6 ratones, de dos meses de edad y del mismo sexo (femenino).

2. El día que se denomina 0 se les administra intraperitonealmente el 10 % de la dosis antigénica total en un volumen de 0,2 ml. En la sección de "Resultados" se anotan las dosis utilizadas en los diferentes experimentos.

3. El día 8 se les inyecta un 45 % de la dosis antigénica total

por vía subcutanea, en 0,2 ml.

4. El día 16 se administra el 45 % restante del material antigénico, nuevamente por vía subcutanea, en 0,2 ml.

5. El día 30 se inoculan 25.000 células CAEL suspendidas en 0,2 ml de NaCl 0,14 M, por vía subcutanea.

6. A partir de este momento se revisan diariamente los ratones registrando la aparición y evolución de tumores.

#### XVII. INMUNOPEROXIDASAS

La técnica de las inmunoperoxidasas consiste en la conjugación de anticuerpos con peroxidasas usando el método de las carbodiimida descrito por E. Kurstak (1971), después se hacen reaccionar los anticuerpos con las células y se localizan los lugares de reacción revelando con bencidina según la técnica de E.D.P. De Robertis y Grasso (1961) modificada.

La localización de los antígenos se puede visualizar al microscopio óptico como manchas azules en las células y al microscopio electrónico como zonas electrónicamente densas.

##### A. Técnica de conjugación.

1. Se mezclan 15 mg de inmunoglobulinas, 45 mg de peroxidasas y 120 mg de carbodiimida en un volumen total de 6 ml de buffer Tris-acético 0,05 M a pH 7,2.

2. La mezcla se incuba durante 12 horas a 4°C en un agitador magnético.

3. Se centrifuga a 3000 x g durante 10 minutos.

4. Se decanta y desprecia el precipitado.

5. El sobrenadante se esteriliza a través de un filtro Swinnex (Millipore) con membrana de 0,22 µm de diámetro de poro y se guarda etiquetado como "inmunoglobulinas conjugadas".

**B. Técnica para la observación al microscopio óptico.**

1. Se fijan las células añadiendo acetona absoluta a 4°C y manteniéndola durante 10 minutos.

2. Se decanta y deja secar al aire.

3. Se añaden las inmunoglobulinas conjugadas con peroxidasas y se incuban a 37°C durante 2 horas o a 4°C durante 12 horas.

4. Se lava la preparación con buffer fosfato 0,1 M pH 7,2 a 4°C durante 5 minutos.

5. Se repite el lavado 2 veces más.

6. Se lava con agua bidestilada a 4°C durante 5 minutos y se deja secar al aire.

7. Se cubre la preparación con molibdato amónico al 0,1 % en NaCl 0,14 M durante 5 minutos.

8. Se decanta y se añade bencidina fresca, manteniéndola durante 90 segundos.

9. Se lava rápidamente con NaCl 0,14 M y se deja secar al aire.

10. Se añade solución acuosa de safranina al 0,25 % y se deja actuar 5 segundos.

11. Se decanta y lava rápidamente con agua bidestilada.



12. Se deja secar al aire y se monta con bálsamo de Canadá, procediendo a su observación al microscopio óptico, en el cual aparecen las zonas positivas teñidas de azul.

C. Técnica para la observación al microscopio electrónico.

1. Se cultivan las células sobre cubreobjetos en tubos de Leighton.
2. Se lavan las células con buffer fosfato 0,1 M a pH 7,2 y 4°C.
3. Se fijan con glutaraldehído al 2,5 % (Fluka) en el mismo buffer a temperatura ambiente durante 1 hora.
4. Se lavan dos veces en buffer fosfato 0,1 M a 4°C durante 15 minutos.
5. Se añade buffer de lavado y se dejan las células con él hasta el día siguiente.
6. Se decanta y se añaden las inmunoglobulinas conjugadas con peroxidasas, incubándolas durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.
7. Se lava con buffer fosfato 0,1 M a pH 7,2 y 4°C durante 8 minutos.
8. Se decanta y añade tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 2 % en buffer fosfato, manteniéndolo 1 hora a 4°C.
9. Se hace una inclusión en agar al 2 %.
10. Se deshidrata en solución de acetona al 50 % una noche y al 70 % dos baños de 15 minutos cada uno.
11. Se contrasta con acetato de uranilo al 0,5 % en acetona al 70 % durante una noche.

12. Se continúa la deshidratación con acetona al 90 % (2 baños de 15 minutos cada uno) y acetona al 100 % (2 baños de 30 minutos cada uno).

13. Se procede a su observación al microscopio electrónico; las regiones positivas aparecen en las células como zonas electrónicamente densas.

D. Disoluciones empleadas.

1. Disolución saturada de bencidina.

Bencidina -----	25	mg
H <sub>2</sub> O tridestilada, añadida a 80°C, c.s.p. -	100	ml

2. Disolución de trabajo de bencidina.

Prepararla fresca según uso

Disolución de bencidina saturada -----	10,0	ml
Peróxido de hidrógeno al 3 % -----	0,02	ml

3. Disolución acuosa de safranina al 0,25 %.

Safranina -----	0,25	g
H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	100	ml

4. Disolución de molibdato amónico al 0,1 %

Molibdato amónico -----	0,1	g
NaCl 0,14 M, c.s.p. -----	100	ml

5. Disolución de tetróxido de osmio al 2 %

OsO <sub>4</sub> -----	2,0	g
Buffer fosfato 0,1 M, c.s.p. -----	100	ml

## 6. Disolución de acetato de uranilo al 0,5 %

Acetato de uranilo -----	0,5	g
Acetona, c.s.p. -----	100	ml

## 7. Buffer Tris-acetato 0,05 M pH 7,2

Tris(hidroximetil)aminometano -----	6,05	g
Acido acético, c.s.p. -----	pH 7,2	
H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	1000	ml

## 8. Buffer fosfato 0,1 M pH 7,2

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O -----	15,6	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -----	14,2	g
H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	1000	ml

## 9. Acetona al 50 %

Acetona -----	50	ml
H <sub>2</sub> O tridestilada -----	50	ml

## 10. Acetona al 70 %

Acetona -----	70	ml
H <sub>2</sub> O tridestilada -----	30	ml

## 11. Acetona al 90 %

Acetona -----	90	ml
H <sub>2</sub> O tridestilada -----	10	ml

## 12. Glutaraldehido al 3 % en buffer de Millonig

Glutaraldehido -----	3	g
Buffer de Millonig, c.s.p. -----	100	ml

## 13. Buffer de Millonig

Fosfato monosódico al 2,26 % -----	83	ml
NaOH al 2,52 % -----	17	ml
H <sub>2</sub> O tridestilada -----	10	ml
Glucosa -----	0,54	g

## XVIII. MEDIDA DE RADIATIVIDAD

La medida de la radiactividad de las muestras se hizo por recuento de centelleo líquido (J.B. Birks, 1967; B.W. Fox, 1976), que consiste en aprovechar el centelleo que por emisión de fotones producen las desintegraciones radiactivas beta al chocar contra ciertas sustancias orgánicas líquidas que actúan como centelleadoras y detectar dichos fotones con un tubo fotomultiplicador.

A. Técnica.

Se toman 500 µl de muestra a la que previamente se le ha añadido 10 % de NaOH 1 N, para disminuir el apagamiento. Se colocan en un vial para recuento. Se introduce para absorber la muestra un disco Whatman GF/C de fibra de vidrio de 2,5 cm de diámetro. Se deja en la estufa a 60°C durante 24 horas para que el disco se seque bien. Se añaden a cada vial 2,7 ml de mezcla de centelleo. Se tapan con tapón de plástico y se introducen dentro de otros viales que se adaptan al contador. Se procede al recuento de los viales después de dejar que se enfríen en 15°C, manteniéndolos previamente en la oscuridad para eliminar la fluorescencia debida a las radiaciones solares.

Para el recuento se utiliza un contador de centelleo líquido Intertechnique modelo SL 4000.

B. Disoluciones empleadas.

1. Mezcla de centelleo

PPO (2-5-difeniloxazol) ----- 5,0 g

Dimetil-POPOP (dimetil-p-bis-{2-5-(fenil oxa-  
zolil)})-benceno) ----- 0,20 g

Tolueno, c.s.p. ----- 1000 ml

2. NaOH 1 N

NaOH ----- 40,0 g

H<sub>2</sub>O tridestilada, c.s.p. ----- 1000 ml

XIX. METODOS CITOLOGICOS

A. Técnica de fijación y tinción de cultivos celulares.

1. Se lava el frasco de cultivo con solución GKN.
2. Se añade fijador de Bouin y se mantiene durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.
3. Se lava dos veces con etanol de 70°
4. Se lava con agua corriente.
5. Se añade hematoxilina de Caracci durante 1 minuto.
6. Se lava con agua corriente.
7. Se lava con agua bidestilada y se mantiene en agua durante 5 minutos.

8. Se añade eosina dejándola actuar durante unos 10 segundos.
9. Se lava con agua bidestilada.
10. Se deshidrata con etanol de 96° durante 1 minuto.
11. Se deshidrata con etanol de 99° durante 1 minuto.
12. Se deshidrata con etanol de 99° y xilol (1:1) durante 15 segundos.
13. Se deshidrata con xilol durante 1 minuto.
14. Se deja secar al aire.
15. Se monta con bálsamo de Canadá.

**B. Técnica para recuento de células totales.**

1. Se toma una muestra de la suspensión celular.
2. Se tiñe con cristal violeta (colorante de núcleos).
3. Se coloca una muestra en la cámara hemocitométrica de Neubauer.
4. Se cuentan las células de las dos cuadrículas de la cámara.
5. Se multiplica el número de células de la cámara por el factor de la cámara, el factor de dilución y el volumen original de suspensión celular, con objeto de conocer el número de células en ésta.

**C. Técnica para recuento de viabilidad celular.**

1. Se toma una muestra de la suspensión celular.
  2. Se realiza la dilución necesaria para facilitar el recuento.
- Dicha dilución depende de la concentración original de la suspensión celular y se hace a cálculo de manera que se obtengan concentraciones finales de

100.000 a 800.000 células/ml.

3. Se toman 0,5 ml de la dilución y se añade 0,15 ml de eritrosina (colorante de exclusión vital que tiñe únicamente las células muertas), esperando unos ocho minutos.

4. Se toman 20 µl de la suspensión anterior teñida y se colocan en una cámara hemocitométrica de Neubauer, 10 µl en cada campo. Se cuenta el número de células en las cámaras.

5. El número total de células en la suspensión original se calcula multiplicando el número de células contadas en la cámara por los factores propios de la cámara, por el factor de dilución y por el volumen de la suspensión original.

D. Disoluciones, fijadores y colorantes empleados.

1. GKN.

Descrita en el apartado I C de "Material y Métodos".

2. Fijador de Bouin

Disolución saturada de ácido pícrico al 1,4 %

en agua -----	75,0 ml
Formalina neutra (formaldehído al 40 %) -----	25,0 ml
Acido acético glacial -----	5,0 ml

## 3. Hematoxilina de Caracci

Hematoxilina -----	0,5	g
Iodato potásico -----	0,1	g
Alumbre potásico -----	25,0	g
Glicerina bidestilada -----	100	ml
H <sub>2</sub> O tridestilada -----	400	ml

## 4. Eosina

Eosina -----	1,0	g
H <sub>2</sub> O tridestilada, c.s.p. -----	100	ml

## 5. Etanol de 70°

Etanol -----	70	ml
H <sub>2</sub> O tridestilada -----	30	ml

## 6. Etanol de 96°

Etanol -----	96	ml
H <sub>2</sub> O tridestilada -----	4	ml

## 7. Eritrosina B al 0,4 %

Eritrosina B -----	4,0	g
Solución GKN, c.s.p. -----	1000	ml

## 8. Cristal violeta al 0,05 %

Cristal violeta -----	1,125	g
Acido cítrico -----	4,80	g
H <sub>2</sub> O, c.s.p. -----	250,0	ml



## RESULTADOS

### I. OBTENCION DE MEMBRANA PLASMATICA

#### A. Ensayos previos.

Para la puesta a punto de la técnica se han realizado algunos ensayos previos que permitieron controlar las etapas, mejorando el rendimiento y llegar con seguridad al objetivo, que era la obtención de antígenos oncoasociados y oncoespecíficos libres de los numerosos antígenos que comparten las células normales y cancerosas.

##### A.1. Homogeneización.

Al homogeneizar las células, era necesario conseguir la ruptura de la membrana plasmática sin que se rompiera la membrana nuclear, pero quedando los núcleos limpios de restos de citoplasma alrededor. Para conocer la fuerza de homogeneización necesaria se realizó una cinética de ruptura con células HeLa, en las diferentes condiciones que se expondrán. Una vez elegidas las mejores condiciones para las células HeLa se aplicó a otros tipos celulares. La cinética de ruptura por homogeneización de las células CAE y CAEL es prácticamente la misma que la de las células HeLa. En cambio, los tejidos se rompían siguiendo una cinética diferente.

##### Cinética de ruptura de las células HeLa.

Se han probado dos tipos de homogeneizadores de Potter y varias velocidades de giro del motor, cuyos resultados quedan señalados en las tablas IV a VII, que corresponden, respectivamente, a las figuras 7 a 10.

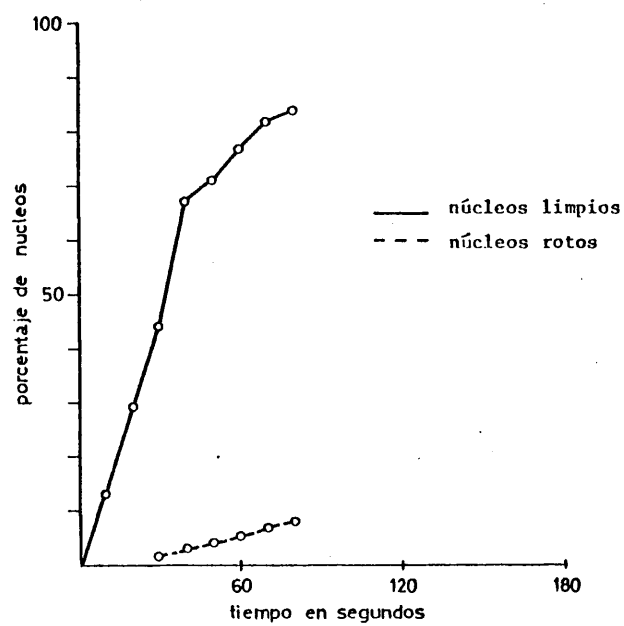
TABLA IV

CURVA DE RUPTURA DE CELULAS HeLa CON HOMOGENEIZADOR DE POTTER  
DE VIDRIO-VIDRIO EN TUBO DE FONDO CONICO, A 2000 rpm

TIEMPO SEG	CELULAS ENTERAS O PARCIALMENTE ROTAS %	NUCLEOS LIMPIOS %	NUCLEOS ROTOS %
10	87	13	0
20	71	29	0
30	55	44,5	0,5
40	30	67,5	2,5
50	25	71	4
60	22	73	5
70	11	82	7
80	0	84	8

FIGURA 7

CINETICA DE HOMOGENEIZACION DE CELULAS HeLa



La cinética de homogeneización de células HeLa se realizó en este caso utilizando un homogeneizador de Potter de vidrio-vidrio en tubo de fondo cónico, a 2000 rpm.

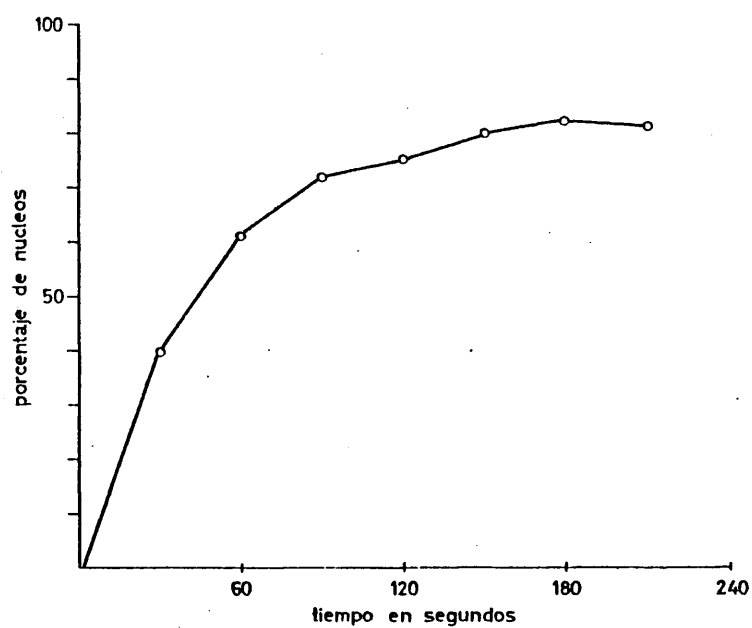
TÁBLA V

CURVA DE RUPTURA DE CELULAS HeLa CON HOMOGENEIZADOR DE POTTER  
DE VIDRIO-TEFLON EN TUBO DE FONDO CILINDRICO, A 3000 rpm

TIEMPO SEG	CELULAS ENTERAS O PARCIALMENTE ROTAS %	NUCLEOS LIMPIOS %	NUCLEOS ROTOS %
30	60	40	0
60	39	61	0
90	28	72	0
120	25	75	0
150	20	80	0
180	18	82	0
210	19	81	0

FIGURA 8

CINETICA DE HOMOGENEIZACION DE CELULAS HeLa



En la homogeneización de las muestras que sirvieron para trazar esta curva se empleó un homogeneizador de Potter de vidrio-teflón en tubo de fondo cilíndrico, a 3000 rpm.

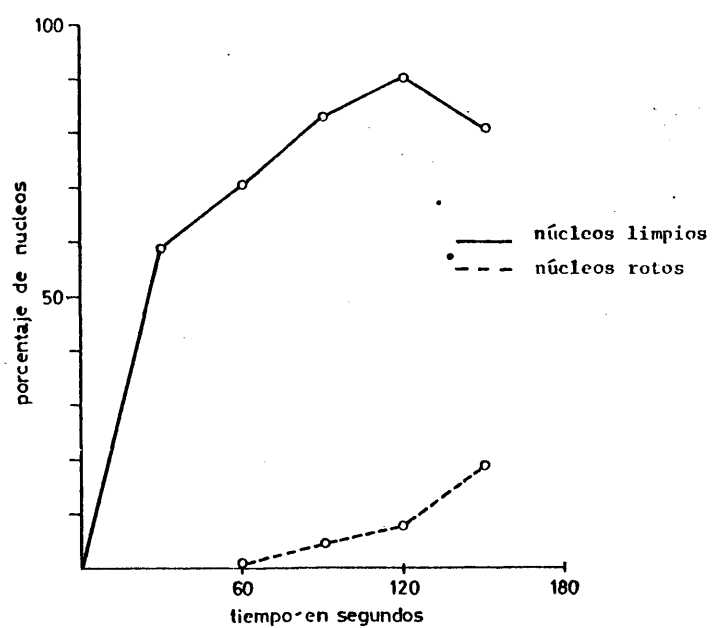
TABLA VI

CURVA DE RUPTURA DE CELULAS HeLa CON HOMOGENEIZADOR DE POTTER  
DE VIDRIO-TEFLON EN TUBO DE FONDO CILINDRICO, A 3500 rpm

TIEMPO SEG	CELULAS ENTERAS O PARCIALMENTE ROTAS %	NUCLEOS LIMPIOS %	NUCLEOS ROTOS %
30	41	59	0
60	28	71	1
90	12	83	5
120	2	90	8
150	0	81	19

FIGURA 9

CINETICA DE HOMOGENEIZACION DE CELULAS HeLa



Las células fueron homogeneizadas en este experimento con un homogeneizador de Potter de vidrio-teflón en tubo de fondo cilíndrico a 3500 rpm.

TÁBLA VII

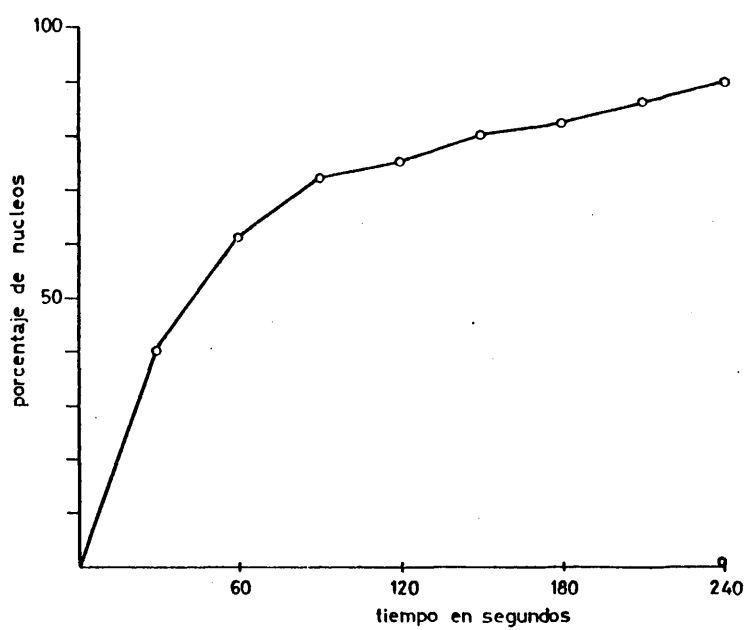
CURVA DE RUPTURA DE CELULAS HeLa CON HOMOGENEIZADOR DE POTTER  
DE VIDRIO-TEFLON EN TUBO DE FONDO CILINDRICO, COMBINANDO DOS VELOCIDADES

TIEMPO SEG	VELOCIDAD rpm	CELULAS ENTERAS O PARCIALMENTE ROTAS	NUCLEOS LIMPIOS	NUCLEOS ROTOS
		%	%	%
30	3000	60	40	0
60	3000	39	61	0
90	3000	28	72	0
120	3000	25	75	0
150	3000	20	80	0
180	3000	18	82	0
210	3500	14	86	0
240	3500	9	90	1



FIGURA 10

CINETICA DE HOMOGENEIZACION DE CELULAS HeLa



El trazado de esta gráfica resultó de homogeneizar las células en un aparato de Potter de vidrio-teflón en tubo de fondo cilíndrico, combinando 3000 y 3500 rpm.

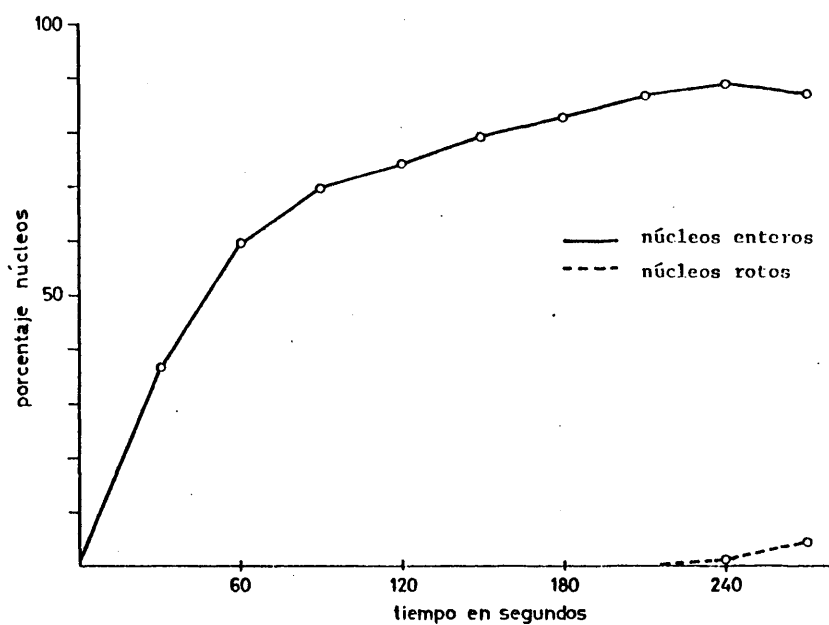
TABLA VIII

CURVA DE RUPTURA DE CELULAS CAEL CON HOMOGENEIZADOR DE POTTER  
DE VIDRIO-TEFLON EN TUBO DE FONDO CILINDRICO, COMBINANDO DOS VELOCIDADES

TIEMPO SEG	VELOCIDAD rpm	CELULAS ENTERAS O PARCIALMENTE ROTAS %	NUCLEOS LIMPIOS %	NUCLEOS ROTOS %
30	3000	83	37	0
60	3000	40	60	0
90	3000	30	70	0
120	3000	26	74	0
150	3000	21	79	0
180	3000	17	83	0
210	3500	13	87	0
240	3500	10	89	1
250	3500	9	87	4

FIGURA 11

CINETICA DE HOMOGENEIZACION DE CELULAS CAEL



Curva obtenida por homogeneización en aparato de Potter de vidrio-teflón, combinando 3000 y 3500 rpm.

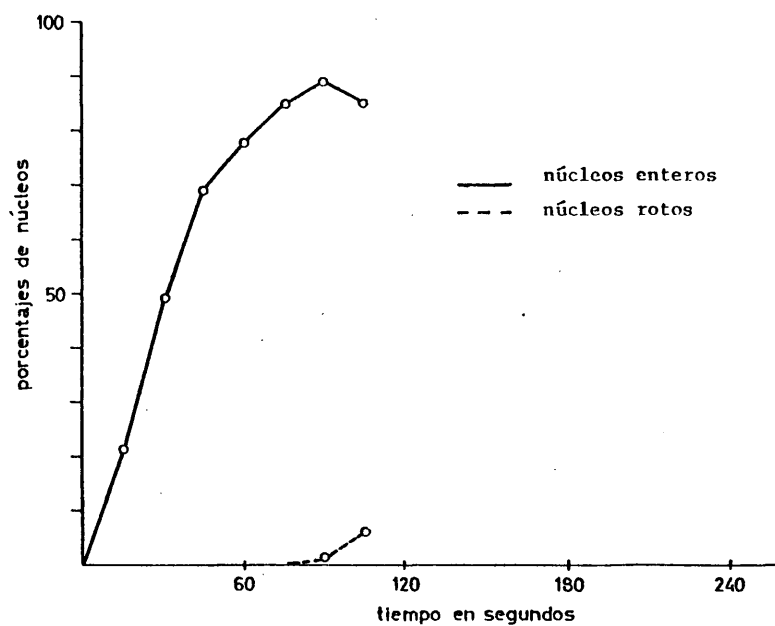
TABLA IX

CURVA DE RUPTURA DE LAS CELULAS PROCEDENTES DE  
TEJIDOS NORMALES DE RATON SWISS (HIGADO, BAZO Y UTERO)  
CON HOMOGENEIZADOR DE POTTER DE VIDRIO-TEFLON, A 3000 rpm

TIEMPO SEG	CELULAS ENTERAS O PARCIALMENTE ROTAS %	NUCLEOS LIMPIOS %	NUCLEOS ROTOS %
15	69	21	0
30	51	49	0
45	31	69	0
60	22	78	0
75	15	85	0
90	10	89	1
105	9	85	6

FIGURA 12

## CINETICA DE HOMOGENEIZACION DE TEJIDO NORMAL



Evolución de la homogeneización de los tejidos normales utilizando homogeneización con aparato de Potter de vidrio-teflón, a 3000 rpm.

Se ha controlado la ruptura de las células tomando muestras a distintos intervalos de tiempo, tiñendo con cristal violeta y haciendo el recuento celular en un microscopio óptico.

Las condiciones elegidas para proseguir el experimento son las obtenidas en la figura 10, es decir, homogeneización a 3000 rpm durante 3 minutos y después a 3500 rpm durante 1 minuto, parando cada 30 segundos para dejar que se enfríe el homogenado y evitar la desnaturalización de las proteínas de membrana.

Una vez elegidas las condiciones de homogeneización se repitió la cinética de ruptura con los otros tipos celulares. Los resultados fueron los mismos para las células CAEL (tabla VIII y figura 11) y las células CAE. Contrariamente, como muestran la tabla IX y la figura 12, la cinética de ruptura de las células procedentes de tejidos, es muy diferente. La naturaleza de los órganos extraídos de animales obligaron a realizar primeramente una homogeneización manual y después una mecánica. Es diferente la consistencia de los distintos tejidos.

Las condiciones elegidas para romper las células de los tejidos consistieron en dar 10 emboladas en un homogeneizador de Potter manual con tubo y majador de vidrio, seguidas de homogeneización mecánica en un aparato de Potter con tubo de vidrio y majador de teflón girando a 3000 rpm durante 90 segundos, parando cada 30 segundos para que no se caliente y desnaturalice el homogenado.

#### A.2. Estudio del gradiente de sacarosa.

Este estudio se realizó para saber exactamente en qué fracciones

se encuentran las membranas para recogerlas sin pérdidas.

En primer lugar se preparó el gradiente discontinuo de sacarosa 48-37 % (p/v) como se indica en el apartado de "Material y Métodos", IV.17 a IV.19, quedando como se ve en la fotografía de la figura 13. Tras centrifugar a  $62.000 \times g$  durante 20 minutos, como se indica en el punto IV.20, se separa el material en bandas como se ve en la figura 14.

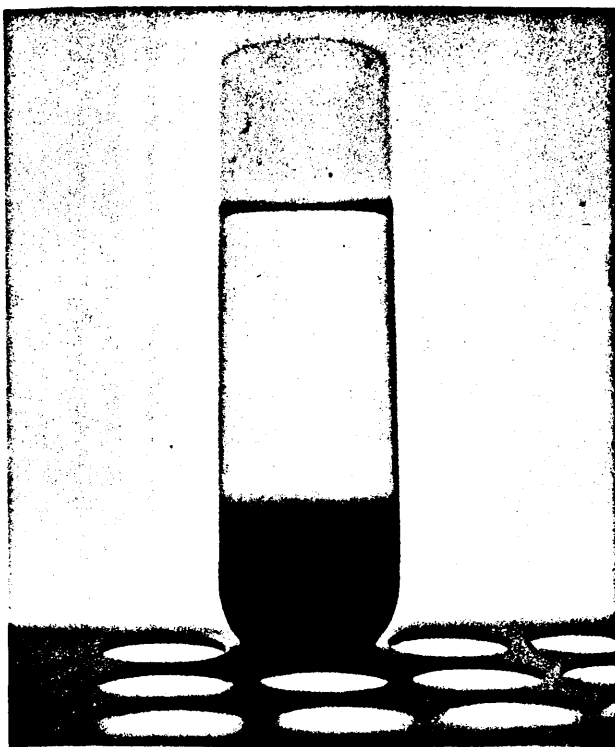
Para analizar las bandas, se fracciona el gradiente en alícuotas de 1 ml, mediante un sifón colocado a 8 mm del fondo del tubo, conectado por el otro extremo a un colector de fracciones al que llegan las muestras después de pasar por una bomba peristáltica y un absorciómetro UV que registra las bandas a una longitud de onda de 257 nm. En la figura 15 se ha esquematizado el montaje para el fraccionamiento en gradiente y en las figuras 16 y 17 se muestran los resultados obtenidos.

También se midió en cada fracción el índice de refracción, el porcentaje de sacarosa (peso/peso y peso/volumen) y la concentración de proteínas.

Los resultados se registran en las tablas X a XIII.

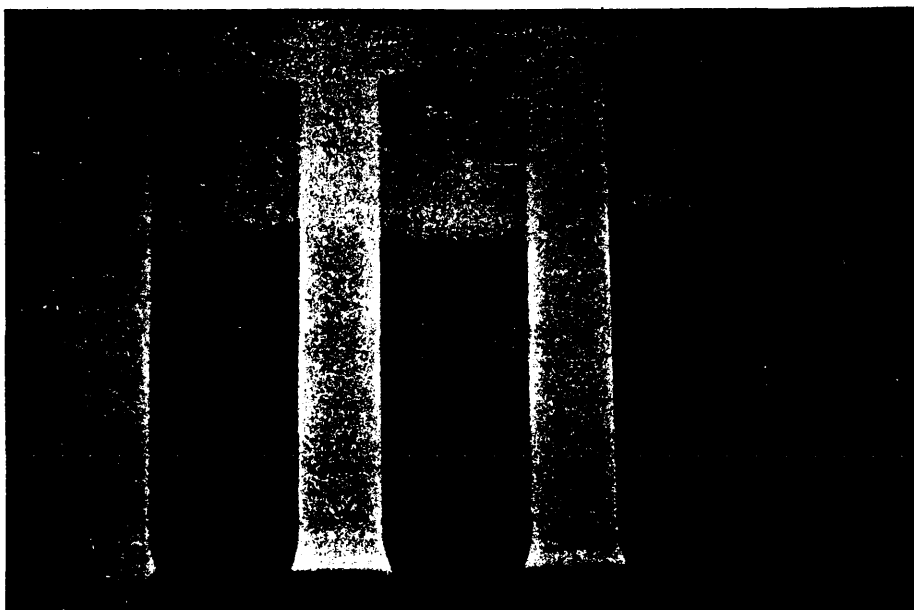
Los valores del índice de refracción para los tejidos normales es algo variable, debido a la gran concentración de material. Asimismo se enmascara el verdadero valor de concentración de sacarosa.

Se hizo un barrido a lo largo del espectro visible y ultravioleta de cada una de las bandas, entre las longitudes de onda de 700 a 200 nm (figuras 18 y 19).

FIGURA 13

Aspecto del tubo preparado con el homogenado antes de  
proceder a la centrifugación en gradiente de sacarosa.

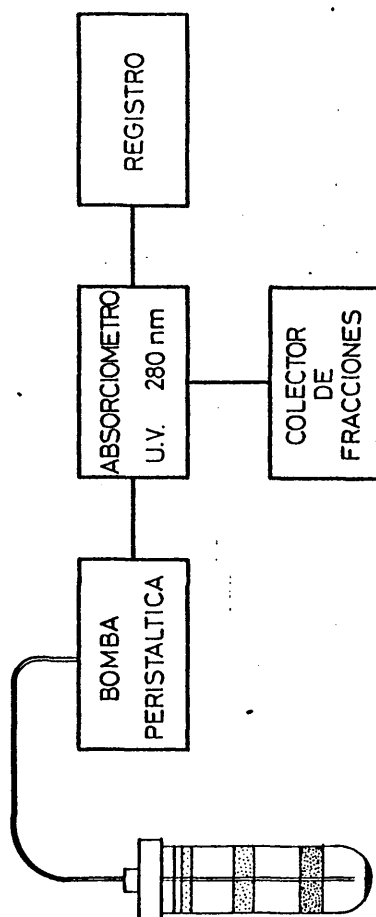


FIGURA 14

Resultado de tres experimentos de fraccionamiento en  
gradiente discontinuo de sacarosa 48-37 % (p/v). Se puede com-  
probar que el procedimiento da resultados reproducibles.

FIGURA 15

ESQUEMA DEL MONTAJE PARA EL FRACCIONAMIENTO DEL GRADIENTE DE DENSIDAD DE SACAROSA

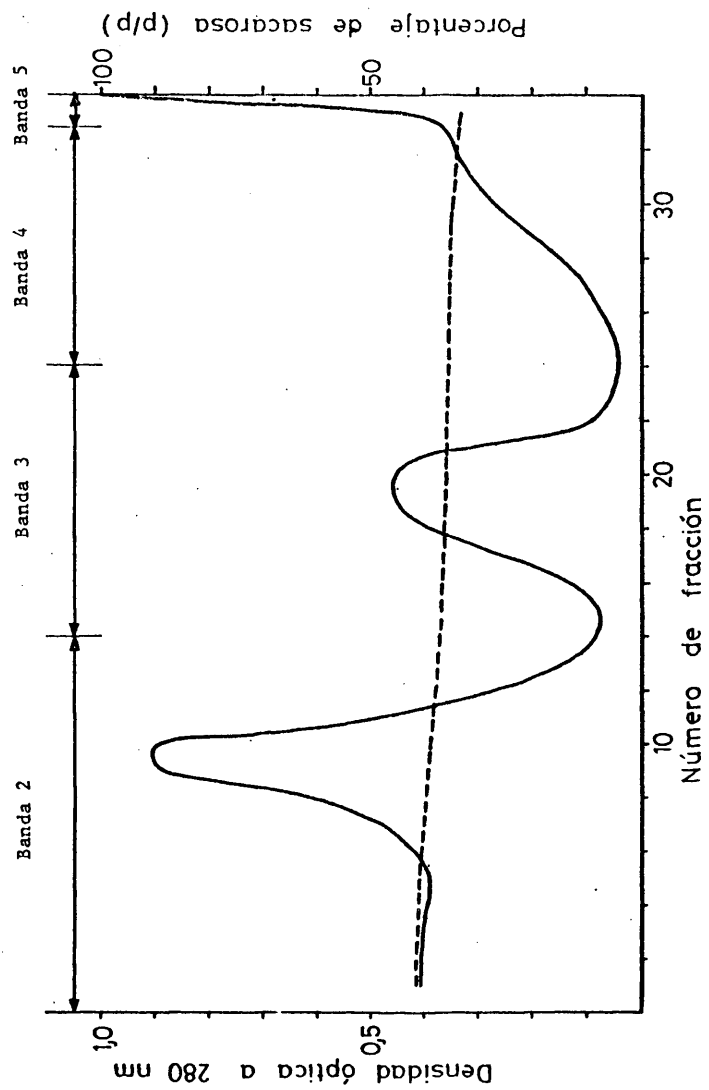


Se introduce la sonda a unos 8 mm de la superficie de la pella, se conecta a la bomba peristáltica que manda el líquido al absorbímetro ultravioleta y de ahí al colector de fracciones. La señal queda reflejada en el registro.

FIGURA 16

PERFIL DEL FRACCIONAMIENTO DE MEMBRANAS DE CAEL

EN UN GRADIENTE DISCONTINUO DE DENSIDAD EN SACAROSA 48-37 % (p/v)



La naturaleza de las bandas es la indicada en la tabla XII.

FIGURA 17

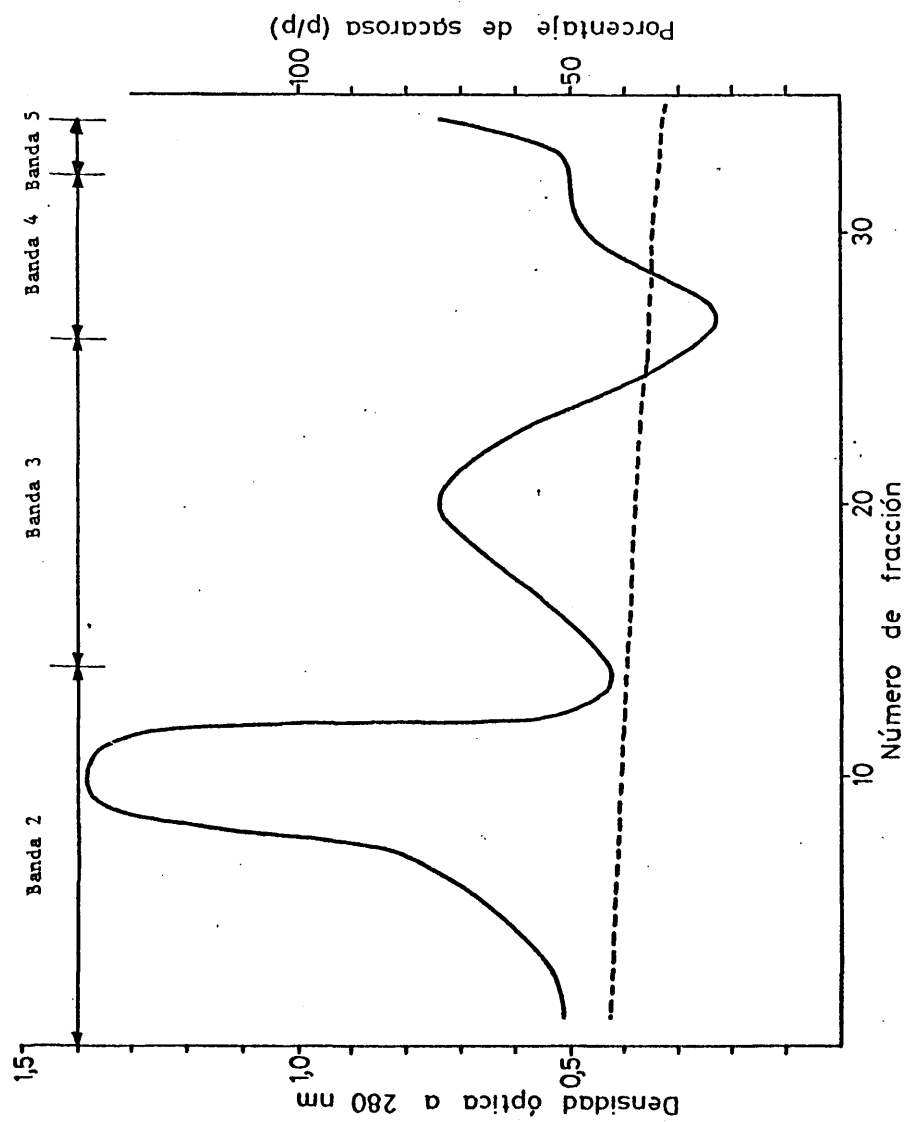


FIGURA 17

PERFIL DEL FRACCIONAMIENTO DE MEMBRANAS DE CELULAS NORMALES  
EN UN GRADIENTE DISCONTINUO DE DENSIDAD EN SACAROSA 48-37 % (p/v)

La naturaleza de las bandas es la indicada en la tabla XIII.

TABLA X

INDICE DE REFRACCION, CONCENTRACION DE SACAROSA Y DENSIDAD  
DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DEL GRADIENTE DE MATERIAL DE CELULAS CAEL

N° DE FRACCION (V = 1 ml)	INDICE DE REFRACCION a 20°C	SACAROSA %		DENSIDAD g/cm <sup>3</sup> a 20°C
		p/p	p/v	
1	1,4017	41	48	1,1817
5	1,4006	40,5	47,5	1,1791
10	1,3958	38,5	45	1,1688
15	1,3930	36,5	41,5	1,1588
20	1,3920	36	41	1,1563
25	1,3915	35,7	40,7	1,1548
30	1,3905	34,3	39	1,1478
34	1,3865	33	37	1,1414

TABLA XI

INDICE DE REFRACCION, CONCENTRACION DE SACAROSA Y DENSIDAD  
DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DEL GRADIENTE  
DE MATERIAL DE TEJIDOS NORMALES

N° DE FRACCION (V = 1 ml)	INDICE DE REFRACCION a 20°C	SACAROSA %		DENSIDAD g/cm <sup>3</sup> a 20°C
		p/p	p/v	
1	1,4045	42,5	50	1,1896
5	1,4031	41,7	49	1,1854
10	1,4006	40,5	47,5	1,1791
15	1,3975	38,9	46,5	1,1704
20	1,3968	38,5	44,7	1,1688
25	1,3915	35,7	40,5	1,1548
30	1,3905	35,3	40	1,1528
34	1,3865	33	37	1,1262

TABLA XII

BANDAS OBTENIDAS DEL MANCOMUNADO DE FRACCIONES  
DEL GRADIENTE DE SACAROSA DE MATERIAL DE CELULAS CAEL

N° DE BANDA	FRACCION CELULAR	PROTEINAS %	INDICE DE REFRACCION	SACAROSA % p/p	FRACCIONES DEL GRADIENTE (*)
1	MITOCONDRIAS	58	1,4030	41,7	PELLA
2	MICROSOMAS	24	1,4012	40,8	1-14
3	MEMBRANAS	11	1,3930	36,5	15-23
4	LIPOPROTEINAS	7	1,3875	33,5	24-33
5	LIPIDOS	0	1,3865	33	34

(\*) CADA FRACCION CORRESPONDE A 1 ml



TABLA XIII

BANDAS OBTENIDAS DEL MANCOMUNADO DE FRACCIONES  
DEL GRADIENTE DE SACAROSA DE MATERIAL DE CELULAS NORMALES

N° DE BANDA	FRACCION CELULAR	PROTEINAS %	INDICE DE REFRACCION	SACAROSA % p/p	FRACCIONES DEL GRADIENTE (*)
1	MITOCONDRIAS	45	1,4056	43	PELLA
2	MICROSOMAS	29	1,4017	41	1-14
3	MEMBRANAS	15	1,3940	37	15-26
4	LIPOPROTEINAS	11	1,3915	35,5	27-33
5	LIPIDOS	0	1,3865	33	34

(\*) CADA FRACCION CORRESPONDE A 1 ml

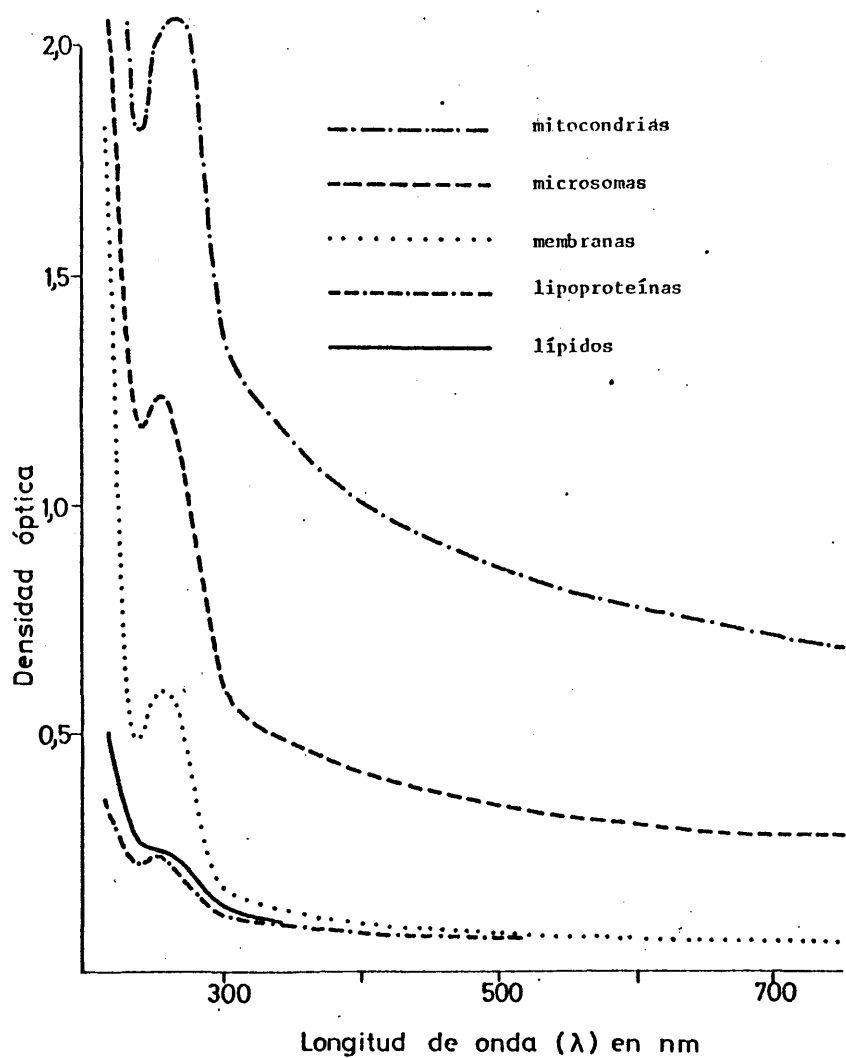


FIGURA 18

CURVAS OBTENIDAS DEL BARRIDO ESPECTROFOTOMETRICO  
DE LAS BANDAS RECOGIDAS DEL GRADIENTE DE DENSIDAD  
EN SACAROSA DE LAS CELULAS CAEL

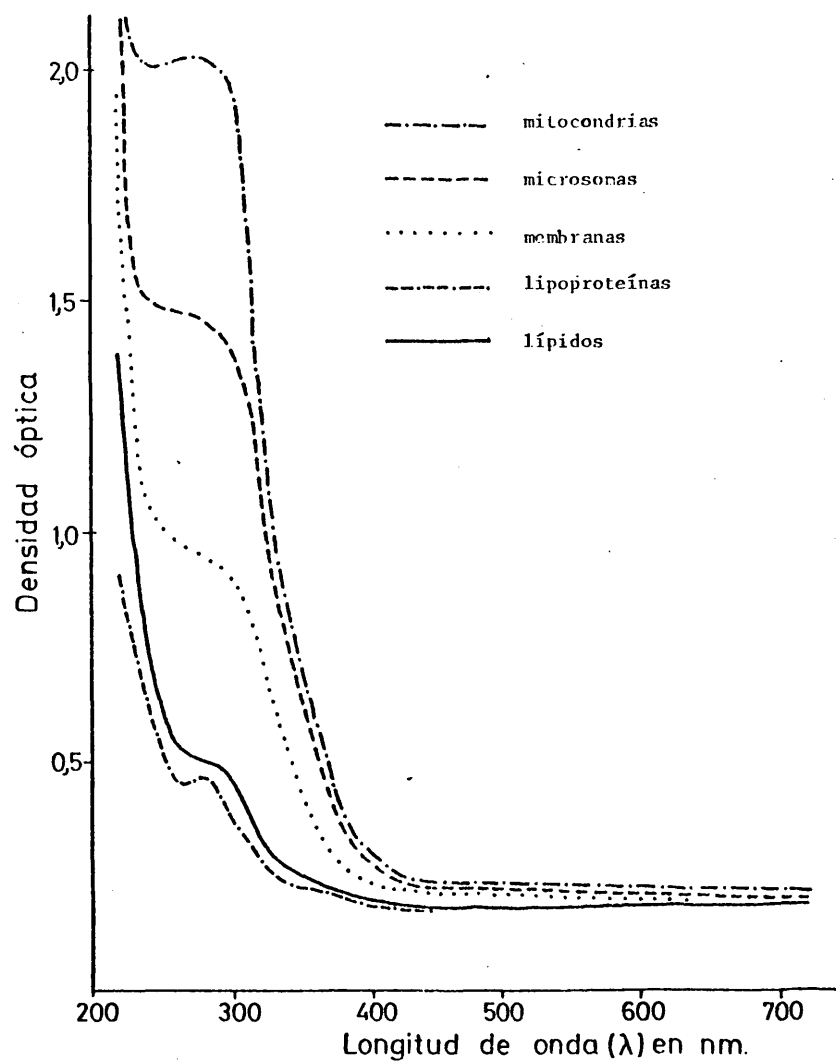


FIGURA 19

CURVAS OBTENIDAS DEL BARRIDO ESPECTROFOTOMETRICO  
DE LAS BANDAS RECOGIDAS DEL GRADIENTE DE DENSIDAD  
EN SACAROSA DE LAS CELULAS NORMALES

## B. Resultados.

### B.1. Células HeLa.

#### a) Procedimiento de obtención de la membrana plasmática.

Se parte de un número de células mínimo de  $1,62 \times 10^9$ , que corresponde a las células cultivadas en 30 frascos de Roux, con  $5,4 \times 10^7$  células cada uno. Se procede a los lavados como se ha descrito en el apartado correspondiente y se homogeneizan 3 minutos a 3000 rpm y 1 minuto a 3500, como se indica en el apartado I.A.1 de "Resultados". La proporción de proteínas de la membrana plasmática purificada con respecto a las proteínas totales de las células es del 1,3 %. Estos datos se utilizaron como guía para la puesta a punto de la técnica de aislamiento de membrana plasmática.

#### b) Resultados obtenidos.

Proteínas totales/ $10^6$ células -----	250 $\mu$ g
N° de células por frasco de Roux -----	$5,4 \times 10^7$
N° de células/ml pella -----	$2,7 \times 10^8$
Proteínas de la fracción cruda sin núcleos ----	59 % (*)
Proteínas de membrana plasmática purificada ----	1,3 % (*)

(\*) Respecto a las proteínas celulares totales.

### B.2. Células CAEL.

#### a) Procedimiento de obtención de la membrana plasmática.

Se utilizó un número de células del orden de  $10^{10}$ , que corresponde al avenado de 10 ratones. Se procedió a lavar las células como se describe en "Material y Métodos", apartado IV.A y se homogeneizaron 3 minutos a 3000 rpm y 1 minuto a 3500 rpm. Se obtuvo una cantidad de proteínas de

membrana purificadas de 1,2 % con respecto a las proteínas celulares totales.

b) Resultados obtenidos.

Volumen de líquido ascítico por ratón -----	6 ± 2 ml
N° de células/ml de líquido ascítico -----	1,6 x 10 <sup>8</sup>
N° de células/ml de pella -----	4.45 x 10 <sup>8</sup>
Proteínas totales/10 <sup>6</sup> células -----	280 ± 40 µg
Proteínas de la fracción cruda sin núcleos -----	57 % (*)
Proteínas de membrana purificada -----	1,2 % (*)

---

(\*) Respecto a las proteínas celulares totales.

B.3. Células CAE.

a) Procedimiento para obtención de la membrana plasmática.

Se emplearon unas 4 x 10<sup>8</sup> células que se trataron como las CAEL, pero teniendo en cuenta que van marcadas con productos radiactivos y por tanto hay que manejarlas con precaución. Todos los sobrenadantes de los lavados se conservan para recuento de radiactividad. El material no se utilizó para separación de fracciones en gradiente discontinuo de sacarosa.

b) Resultados obtenidos.

N° de células por tubo -----	3,5 x 10 <sup>7</sup>
N° de células/ml de pella -----	2,85 x 10 <sup>8</sup>
Proteínas totales/10 <sup>6</sup> células -----	340 µg
Proteínas de la fracción cruda sin núcleos -----	59 % (*)

---

(\*) Respecto a las proteínas celulares totales.

#### B.4. Tejidos normales.

##### a) Procedimiento de obtención de la membrana plasmática.

Los tejidos que se utilizaron para obtener membranas plasmáticas de células normales fueron hígado, bazo y útero de ratones adultos de la cepa Swiss. Se partió de un peso de tejido de unos 20 g con la proporción de órganos correspondiente teniendo en cuenta que el peso del hígado es de 1,21 g, del bazo 0,14 g y del útero 0,24 g aproximadamente por animal. Se utilizaron ratones macho y hembra, unos seis de cada sexo para cada experimento. Se siguió el procedimiento de lavado habitual, obteniéndose una proporción de proteínas de membrana purificadas de 2,5 % con respecto a las proteínas existentes en el homogenado (135 mg/g de tejido).

##### b) Resultados obtenidos.

Proteínas totales/g de tejido -----	135 mg
Proteínas de la fracción cruda sin núcleos --	82 % (*)
Proteínas de membrana plasmática purificada -	2,5 % (*)

---

(\*) Respecto a las proteínas celulares totales.

## II. SOLUBILIZACION DE MEMBRANAS

### A. Estudio de agregación.

Al utilizar la membrana plasmática solubilizada con ondas ultrasónicas se vio que casi enseguida de su obtención se produce una agregación de los fragmentos de membrana, lo que tiene diversos inconvenientes que se exponen en la "Discusión". Con objeto de conocer los factores que intervie-

nen en dicha agregación y corregirla, se hicieron los siguientes experimentos.

A.1. Factores que influyen en la agregación y evolución en el tiempo.

Los factores examinados en relación con su posible influencia sobre el agregamiento de fragmentos de membrana plasmática solubilizados con ultrasonidos fueron:

a) Factores químicos:

- variaciones de la fuerza iónica (figura 20)
- variaciones del pH (figura 21)
- presencia de iones divalentes (figura 22)

b) Factores físicos:

- congelación (figura 23)
- tamaño de la unidad mínima de agregación (figura 23).

Antes de su solubilización por sonicación las membranas se pusieron en un medio que no contenía NaCl. Dicho medio consistió en Tris 20 mM + fluoruro de fenil-metil-sulfonil 100  $\mu$ M + Triton X-100 al 0,05 %.

Se procedió a su solubilización sonicando durante 3 minutos en ciclos de 30 segundos, a 4°C.

El producto se ultracentrifugó a 100.000 x g durante 60 minutos. (Ultracentrífuga IEC, modelo B-60, rotor SB-405, 32.000 rpm.)

Inmediatamente después de parar la centrífuga se añadieron 300  $\mu$ l del sobrenadante obtenido, en cada uno de los tubos que ya contenían las disoluciones convenientes, según el factor que se quisiera estudiar, como se indica en las tablas XIV a XVII.

FIGURA 20

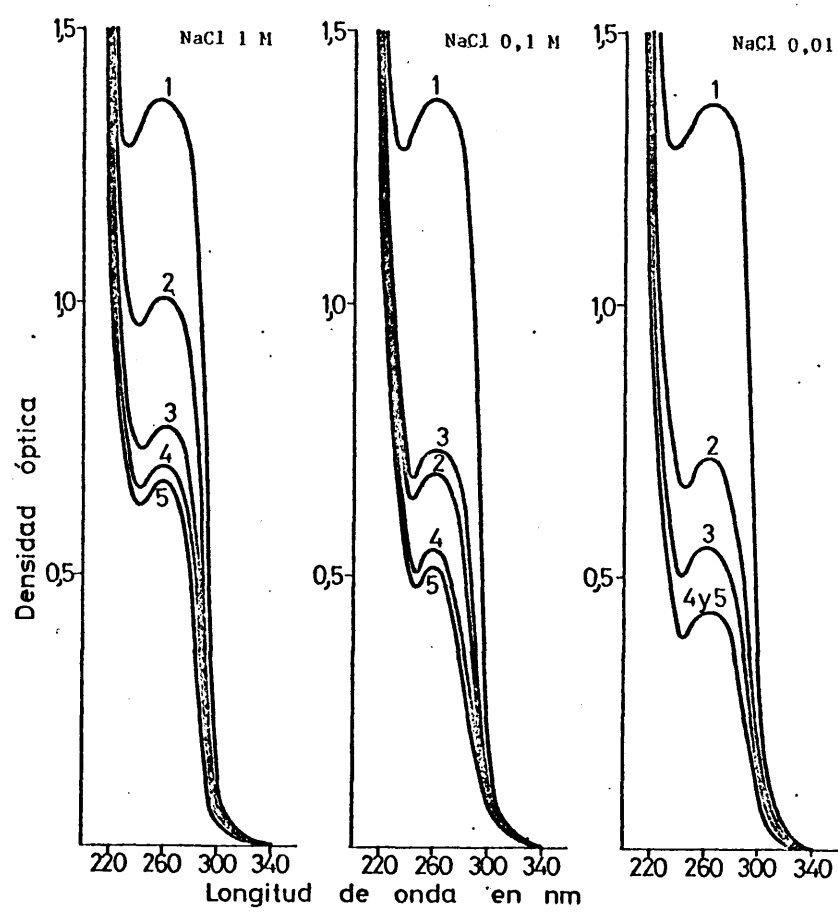




FIGURA 20

EFFECTO DE LAS VARIACIONES DE LA FUERZA IONICA EN LA AGREGACION DE  
FRAGMENTOS DE MEMBRANA PLASMATICA SOLUBILIZADAS POR ONDAS ULTRASONICAS

1: tiempo 0; 2: a las 6 horas; 3: a las 24 horas; 4: a las 48 horas;  
5 a las 96 horas. Hacia las 96 horas se alcanzaba la estabilización, obte-  
niéndose curvas similares a las número 5.

FIGURA 21

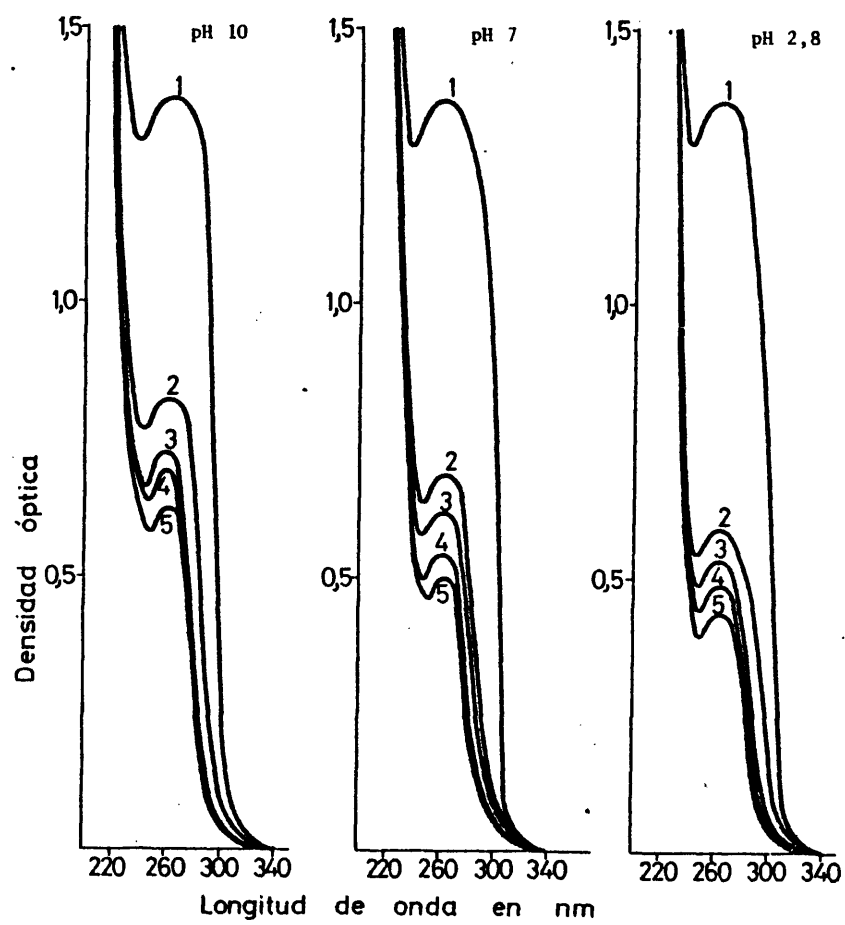


FIGURA 21

EFFECTO DE LAS VARIACIONES DEL pH SOBRE LA AGREGACION DE  
FRAGMENTOS DE MEMBRANA PLASMATICA SOLUBILIZADA

Los números de las curvas corresponden a los mismos períodos que los indicados en la figura 20. La estabilización se alcanzó también hacia las 96 horas.

FIGURA 22

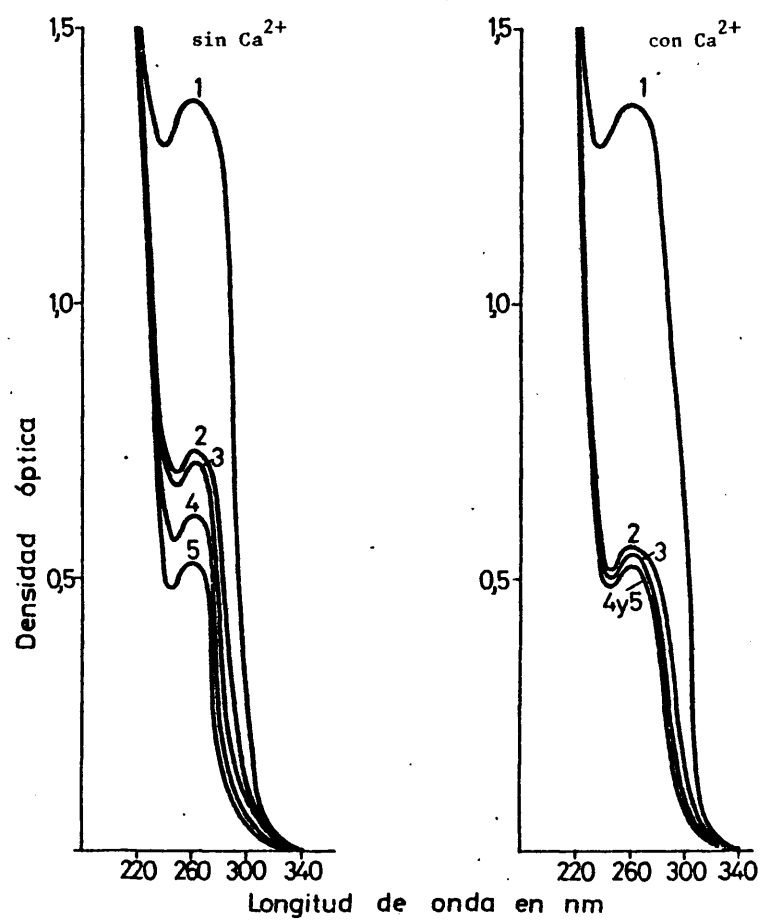


FIGURA 22

EFFECTO DE LOS IONES DE  $\text{Ca}^{2+}$  SOBRE LA AGREGACION DE  
FRAGMENTOS DE MEMBRANA PLASMATICA SOLUBILIZADA

Los números de las curvas corresponden a los mismos períodos que los indicados en la figura 20. La estabilización se alcanzó también hacia las 96 horas.

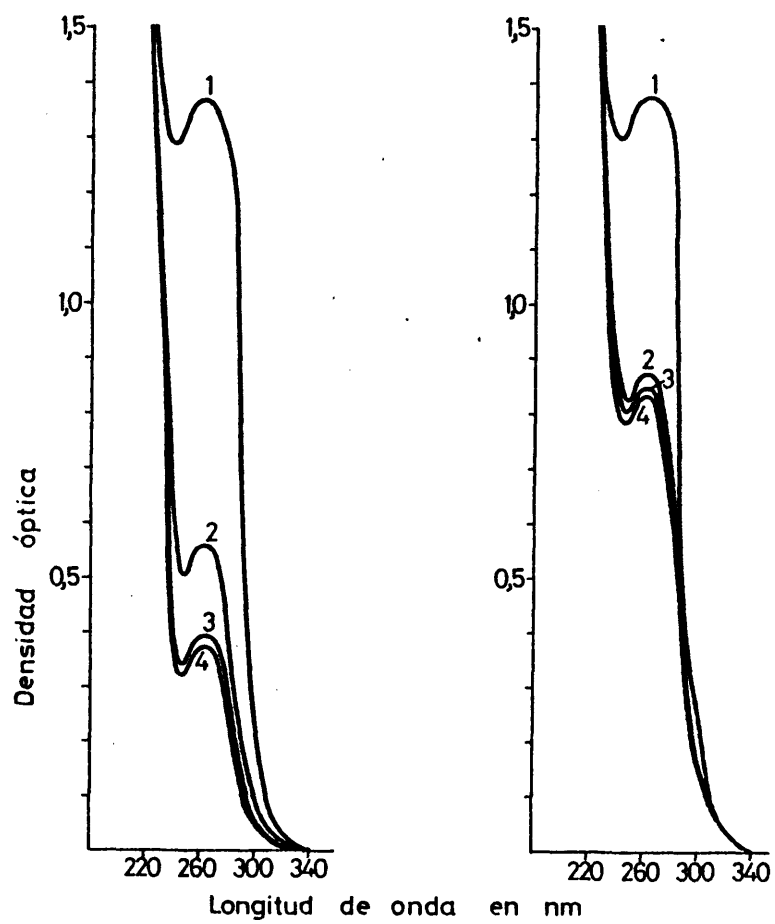
FIGURA 23

FIGURA 23

EFFECTO DE LA CONGELACION Y EL TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS  
EN EL FENOMENO DE AGREGACION

La gráfica de la izquierda corresponde a los fragmentos de membrana plasmática solubilizada en los períodos siguientes: 1: tiempo 0; 2: a las 24 horas; 3: a las 48 horas; 4: a las 96 horas.

Las curvas de la gráfica que está a la derecha de esta figura nos indica el efecto del tamaño de los fragmentos de membrana plasmática sobre el fenómeno de agregamiento. Las curvas corresponden a los intervalos siguientes: 1: tiempo 0; 2: a las 6 horas; 3: a las 24 horas; 4: a las 48 horas.

Para realizar cada análisis se tomaron los tubos, se centrifugaron a  $100.000 \times g$  durante 60 minutos, se prepararon las mezclas de incubación y se hizo un barrido espectrofotométrico del sobrenadante en las longitudes de onda comprendidas entre 340 y 220 nm. El análisis espectrofotométrico se inició en el momento de preparar las mezclas de incubación (tiempo 0) y se repitió en los intervalos indicados en las figuras 20 a 23. En los períodos intermedios, las membranas se conservaron a  $4^{\circ}\text{C}$ , excepto para estudiar el efecto de la congelación, en cuyo caso se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

TABLA XIV

INFLUENCIA DE LAS VARIACIONES DE LA FUERZA IONICA  
SOBRE LA AGREGACION DE FRAGMENTOS DE LA  
MEMBRANA PLASMATICA SOLUBILIZADA CON ONDAS ULTRASONICAS

MEMBRANAS DE CAEL	MEDIO EMPLEADO	VOLUMEN DE MEDIO	VOLUMEN TOTAL	CONCENTRACION FINAL DE NaCl
$\mu\text{l}$		$\mu\text{l}$	$\mu\text{l}$	
300	C1Na 2 M	300	600	1 M
300	C1Na 0,2	300	600	0,1 M
300	C1Na 0,02	300	600	0,01 M





TABLA XV

INFLUENCIA DE LAS VARIACIONES DEL pH  
SOBRE LA AGREGACION DE FRAGMENTOS DE LA  
MEMBRANA PLASMATICA SOLUBILIZADA CON ONDAS ULTRASONICAS

MEMBRANAS DE CAEL $\mu\text{l}$	SOLUCION DE TRIS-NaCl EMPLEADA	VOLUMEN DE MEDIO $\mu\text{l}$	VOLUMEN TOTAL $\mu\text{l}$	NaCl 4 M $\mu\text{l}$
300	pH 10	300	600	10
300	pH 7	300	600	10
300	pH 2,8	300	600	10

TABLA XVI

INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE IONES DIVALENTES  
SOBRE LA AGREGACION DE FRAGMENTOS DE LA  
MEMBRANA PLASMATICA SOLUBILIZADA CON ONDAS ULTRASONICAS

MEMBRANAS DE CAEL $\mu\text{l}$	MEDIO EMPLEADO	VOLUMEN DE MEDIO $\mu\text{l}$	VOLUMEN TOTAL $\mu\text{l}$	NaCl 4 M $\mu\text{l}$	Ca <sup>2+</sup>
300	TRIS-NaCl pH 7,4	300	600	10	no
300	TRIS-NaCl- Cl <sub>2</sub> Ca	300	600	10	sí (*)

(\*) A una concentración final de CaCl<sub>2</sub> 1 mM

## TABLA XVII

INFLUENCIA DE LA CONGELACION  
 SOBRE LA AGREGACION DE FRAGMENTOS DE LA  
 MEMBRANA PLASMATICA SOLUBILIZADA CON ONDAS ULTRASONICAS

MEMBRANAS DE CAEL	MEDIO EMPLEADO	VOLUMEN DE MEDIO	VOLUMEN TOTAL	NaCl 4 M
$\mu\text{l}$		$\mu\text{l}$	$\mu\text{l}$	$\mu\text{l}$
300	TRIS-NaCl			
	pH 7,4	300	600	10

Estudio de la unidad mínima de agregación de los fragmentos de  
 membrana plasmática solubilizada con ondas ultrasónicas.

En este caso fue necesario hacer primeramente una selección de las membranas solubilizadas por el tamaño de sus moléculas. Esto se consiguió diafiltrando las membranas recién solubilizadas por una membrana cuyo tamaño de poro impidiera el paso de fragmentos cuyo peso molecular fuera superior a 25.000 dalton. El diafiltrado obtenido fue el que se utilizó en lugar de las membranas solubilizadas propiamente dichas empleadas en los experimentos anteriores.

Como se dijo anteriormente, los preparados, en las distintas condiciones indicadas, se analizaron espectrofotométricamente a diferentes intervalos de tiempo, obteniendo los resultados recogidos en las figuras 21 a 23.

Los experimentos mostraron que la agregación de fragmentos de membrana plasmática solubilizada por ondas ultrasónicas tiene lugar en to-

das las condiciones ensayadas de fuerza iónica, pH, presencia de iones divalentes y congelación. No obstante, la congelación favorece la agregación. En relación con el diafiltrado, que contenía únicamente moléculas o fragmentos de membrana inferiores a los 25.000 D, se observó que el grado de agregamiento es menor, aunque existe, y no sobrepasa al registrado hacia las 6 horas con el material no diafiltrado.

Finalmente, se vió que el fenómeno de agregación comienza a producirse inmediatamente después de la solubilización, puesto que el primer punto (6 horas) no difiere demasiado del punto de equilibrio (agregación máxima). Por este motivo estudiamos la agregación durante las primeras 6 horas. Al efecto se prepararon 2 ml del producto, se pasaron cada 30 minutos por un filtro Millex y se leyó la muestra al espectrofotómetro en los intervalos indicados en la figura 24, en las que se comprueba la evolución de la agregación.

#### A.2: Disoluciones empleadas.

##### NaCl 4 M

NaCl -----	23,376 g	
H <sub>2</sub> O, c.s.p. -----	100	ml

##### NaCl 2 M

NaCl 4 M -----	50	ml
H <sub>2</sub> O -----	50	ml

##### NaCl 0,2 M

NaCl 2 M -----	10	ml
H <sub>2</sub> O -----	90	ml

FIGURA 24

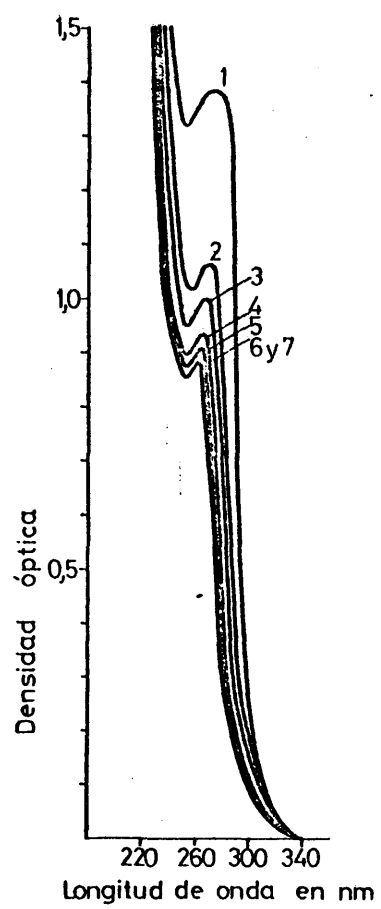


FIGURA 24

ESTUDIO DEL FENOMENO DE AGREGACION  
DE LOS FRAGMENTOS DE MEMBRANA PLASMATICA SOLUBILIZADA  
POR SONICACION DURANTE LAS PRIMERAS 6 HORAS

Las curvas corresponden a los siguientes intervalos de tiempo: 1: tiempo 0; 2: al cabo de 1 hora; 3: a las 2 horas; 4: a las 3 horas; 5: a las 4 horas; 6: a las 5 horas; 7: a las 6 horas.

NaCl 0,02 M

NaCl 2 M ----- 1 ml

H<sub>2</sub>O ----- 99 mlTris 20 mM, fluoruro 100 µM, triton X-100 al 0,05 %, pH 7,4

Tris(hidroximetil)aminometano ----- 0,24228 g

Fluoruro de fenil-metil-sulfonil ----- 1,74 mg

Triton X-100 ----- 0,05 ml

HCl 1 N ----- 1,2 ml

H<sub>2</sub>O, c.s.p. ----- 100 mlNaCl 0,14 M Tris 20 mM, pH 10

Tris(hidroximetil)aminometano ----- 0,24 g

NaCl ----- 0,80 g

H<sub>2</sub>O, c.s.p. ----- 100 mlNaCl 0,14 M Tris 20 mM, pH 7,4

Tris(hidroximetil)aminometano ----- 0,24 g

NaCl ----- 0,80 g

HCl 1 N ----- 1,5 ml

H<sub>2</sub>O, c.s.p. ----- 100 mlNaCl 0,14 M Tris 20 mM, pH 2,8

NaCl ----- 0,80 g

Tris ----- 0,24 g

HCl 1 N ----- 2,2 ml

H<sub>2</sub>O, c.s.p. ----- 100 ml

NaCl 0,14 M, Tris 20 mM CaCl<sub>2</sub> 2 mM

NaCl ----- 0,80 g

Tris ----- 0,24 g

CaCl<sub>2</sub> ----- 34,8 mg

HCl 1 N ----- 1,5 ml

H<sub>2</sub>O, c.s.p. ----- 100 ml

Para la preparación de todas estas disoluciones se utilizó agua desionizada y bidestilada.

### III. INMUNOSUEROS OBTENIDOS

#### A. Inmunosuero anti-peroxidasas.

Para las pruebas previas de cromatografía de afinidad que se hicieron para poner a punto la técnica, se inmunizó un conejo contra peroxidasa, seleccionada por tratarse de una proteína pura de fácil seguimiento, muy útil como control.

La inmunización se realizó administrando 0,35 mg de peroxidasa en 0,1 ml de buffer fosfato 0,05 M pH 6,9, una vez por semana durante 6 semanas por vía subcutánea y una última dosis de 2 mg de antígeno en 2 ml de buffer potenciada con un volumen igual de coadyuvante de Freund completo, repartida a partes iguales entre las cuatro patas y la región interescapular.

Una vez obtenido el inmunosuero se estudiaron sus características.

#### A.1. Prueba del anillo.

Se realizó la prueba del anillo, descrita en el apartado de "Ma-

terial y Métodos", para ver si los anticuerpos eran precipitinas.

Se vio que se producía el anillo en la interfase y se prosiguió el estudio.

#### A.2. Título del inmunosuero.

Se calculó el título del inmunosuero por inmunodifusión doble en agar al 1 %. Para ello se colocó el antígeno (peroxidasa) en el pocillo central y diluciones crecientes de factor 2 en NaCl 0,14 M en los pocillos periféricos.

El título del inmunosuero obtenido fue de 1/16, correspondiente a la última dilución que produjo una banda de precipitación.

#### A.3. Curva de precipitación cuantitativa.

Se dispusieron 10 tubos con 0,5 ml de antisuero a la dilución de 1/4 y se añadieron 0,5 ml de diluciones crecientes de peroxidasa. Se incubaron a 37°C durante 1 hora, se centrifugaron a 3000 x g durante 15 minutos, se decantaron, se eliminaron las sobrenadantes y se realizó el análisis cuantitativo de proteínas, obteniéndose la curva que aparece en la figura 25 que corresponde a la tabla XVIII.

#### A.4. Punto de equivalencia.

El punto de equivalencia, que se encuentra en un punto inmediatamente anterior al máximo, se toma como base para los cálculos.

Encontramos que 1 ml de inmunosuero antiperoxidasa contiene 2 mg de inmunoglobulinas específicas, que representan un 20 % del total de las inmunoglobulinas.

Cálculos realizados.

En el punto de equivalencia, la cantidad de precipitado (complejo



antígeno-anticuerpo) es de 292,5  $\mu\text{g}$ , que corresponde a 18,75  $\mu\text{g}$  de antígeno. Por tanto, la cantidad de anticuerpo en el precipitado será 273,75  $\mu\text{g}$ . Como se ha puesto 0,125 ml de antisueño (0,5 ml de la dilución 1/4), el valor corresponde a 2 mg/ml.

#### A.5. Valencia antigénica.

Para calcular los determinantes antigénicos hay que tener en cuenta el número de moléculas de cada uno de los componentes que forman el precipitado.

El número de moléculas de un compuesto se deduce de dividir su peso por su peso molecular.

$$- \text{N}^\circ \text{ de moléculas de anticuerpo: } \frac{273,75}{150.000} = 0,0018 \text{ molécula}$$

$$- \text{N}^\circ \text{ de moléculas de antígeno : } \frac{18,75}{40.000} = 0,00047 \text{ molécula}$$

$$- 0,0018/0,00047 = 3,8$$

Por tanto, la valencia antigénica de los anticuerpos antiperoxidasa es 4.

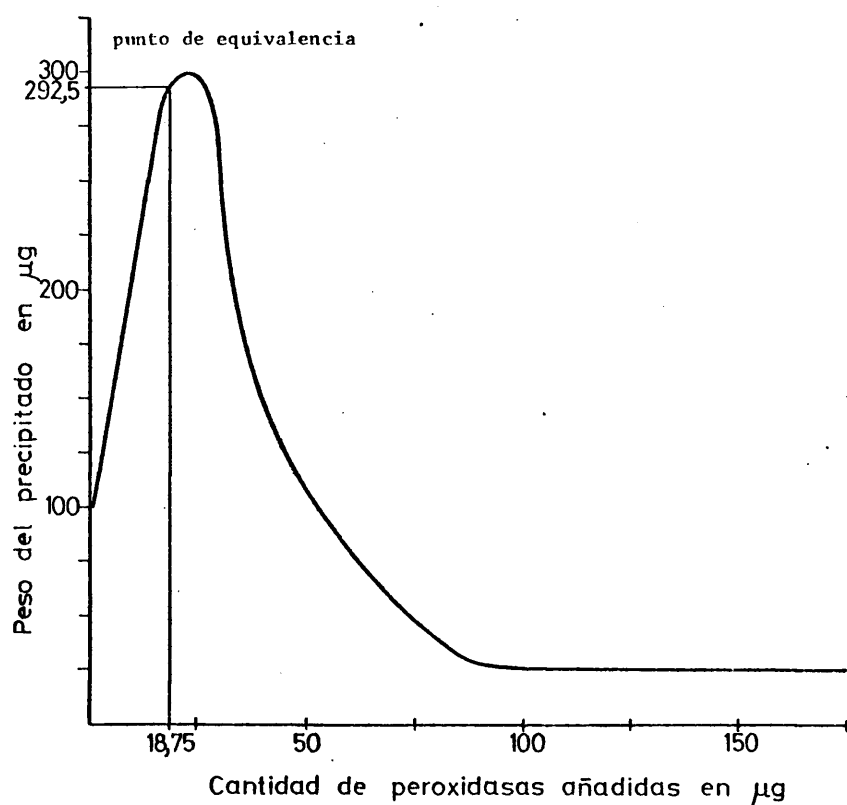
#### B. Inmunosueros anti-membranas.

Se han preparado 3 tipos de inmunosueros anti-membrana plasmática:

a) un inmunosero anti-membrana de células de tejido normal (hígado, útero y bazo de ratón Swiss normal), para utilizarlo en la quimerización; b) un inmunosero anti-membrana de células cancerosas, células CAEL, y c) un tercer inmunosero antimembrana de células CAEL, pero en este caso específico contra los antígenos diferenciales respecto a las células normales, puesto

FIGURA 25

CURVA DE PRECIPITACION CUANTITATIVA



Curva de precipitación cuantitativa entre peroxidasa y antisuero anti-peroxidasa. Esta curva de precipitación se obtuvo añadiendo diversas concentraciones de peroxidasa a una cantidad fija de antisuero. Permite deducir el punto de precipitación máxima y el punto de equivalencia, que corresponde a un punto inmediatamente anterior al de máxima precipitación.

TABLA XVIII

CURVA DE PRECIPITACION CUANTITATIVA  
DEL INMUNOSUERO ANTIPEROXIDASA

PEROXIDASA	ANTISUERO	COMPLEJO ANTIGENO-ANTICUERPO
µg	ml	µg
175,0	0,125	28
87,5	0,125	27
43,75	0,125	140
21,87	0,125	300
10,94	0,125	210
5,47	0,125	145
2,73	0,125	98
1,37	0,125	76
0,7	0,125	55
0,35	0,125	46

que se han utilizado conejos quimera inmunológica, es decir, inmunotolerantes a los antígenos de membrana plasmática de células normales de ratón.

Con estos inmunosueros se realizaron las siguientes pruebas.

**B.1. Prueba del anillo.**

Esta prueba fue negativa para los tres inmunosueros, es decir, que

los anticuerpos anti-membrana normal o cancerosa formados no son precipitinas, como fue el caso de los anticuerpos antiperoxidasa. Por tanto, no se llevaron a cabo la titulación por inmunodifusión ni la curva de precipitación cuantitativa, que dependen de la existencia de precipitinas.

#### B.2. Micrométodo para titulación de citotoxicidad.

Se ha realizado la prueba de citotoxicidad en microplacas de Terasaki, observándose que los anticuerpos anti-membrana plasmática son citotóxicos.

Para calcular el título de los antisueros se prepararon las microplacas depositando 500 células en cada pocillo, sea normales (línea EREA) o cancerosas (línea CAEL), ambas de ratón. Las células se pusieron en presencia de diluciones crecientes de los distintos inmunosueros en solución GKN, considerando como título del antisuero la última dilución capaz de producir una mortalidad del 100 % de las células.

Estos datos quedan reflejados en las tablas XIX y XXy en las figuras 26 y 27:

También se comprobó que la reacción de citotoxicidad es dependiente del complemento, puesto que cuando se realizaron con inmunosueros inactivados las pruebas mencionadas anteriormente, los resultados fueron totalmente negativos. Como era de suponer, estos inmunosueros inactivados recuperan su actividad si se suplementan con complemento.

Los títulos obtenidos fueron los siguientes:

a) título del inmunosero anti-membrana plasmática de células normales: 1/32,

b) título del inmunosero anti-membrana plasmática de célu-

las CAEL obtenido de conejos inmunizados por el sistema tradicional: 1/64,

c) título del inmunosuero anti-membrana plasmática CAEL  
obtenido de conejos quimera inmunológica, hechos inmunotolerantes a los  
antígenos normales: 1/64.

TABLA XIX

TITULO DE LOS DIVERSOS ANTISUEROS VALORADOS POR CITOTOXICIDAD

FRENTE A CELULAS CAEL

DILUCION DEL INMUNOSUERO	PORCENTAJE DE CELULAS MUERTAS CON CADA INMUNOSUERO		
	INMUNOSUERO ANTI-MEMBRANAS NORMALES	INMUNOSUERO ANTI-MEMBRANAS DE CAEL	INMUNOSUERO DE CONEJO QUIMERA ANTI-MEMBRANA DE CAEL
1/2	100	100	100
1/4	100	100	100
1/8	100	100	100
1/16	94	100	100
1/32	55	94	100
1/64	13	60	92
1/128	5	15	15
1/256	5	6	6

FIGURA 26

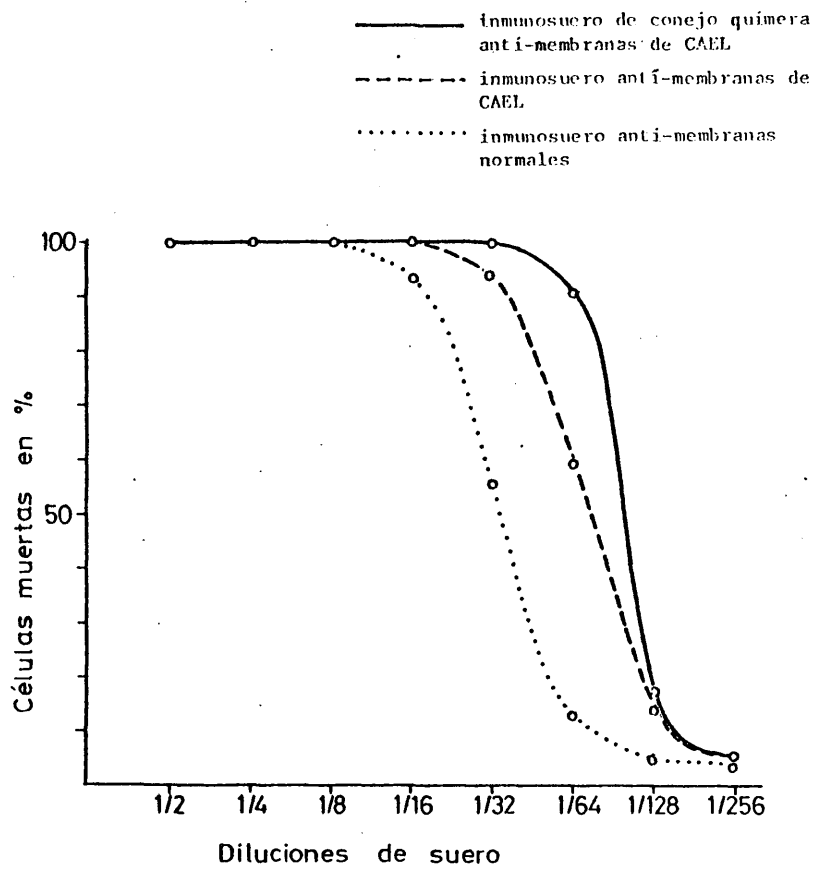


FIGURA 26

TITULACION DE LA CITOTOXICIDAD  
DE DIVERSOS ANTISUEROS SOBRE LAS CELULAS CAEL

La titulación se hizo en microplacas de Terasaki por el método de Takasugi y Kelen. Se tomó como título del antisero la última dilución que consiguió matar al 100 % de las células.

TABLA XX

TITULO DE LOS DIVERSOS ANTISUEROS VALORADOS POR CITOTOXICIDAD  
FRENTE A CELULAS EREA

DILUCION DEL INMUNOSUERO	PORCENTAJE DE CELULAS MUERTAS CON CADA INMUNOSUERO		
	INMUNOSUERO ANTI-MEMBRANAS NORMALES	INMUNOSUERO ANTI-MEMBRANAS DE CAEL	INMUNOSUERO DE CONEJO QUIMERA ANTI-MEMBRANAS DE CAEL
1/2	100	100	100
1/4	100	100	100
1/8	100	100	100
1/16	100	100	100
1/32	100	100	100
1/64	80	100	95
1/128	16	50	44
1/256	5	10	7

8.1. Valoración cualitativa de los inmundosueros obtenidos por diferentes procedimientos.

Condiciones de los ensayos.

Se utilizaron microplacas de Terasaki sembradas con 500 células por pocillo, a las que se añadieron 10 µl de medio esencial mínimo de Eagle conteniendo los distintos antisueros. En todos los casos se ensayaron las dosis mínimas de antisuero capaces de producir el 100 % de mort-



FIGURA 27

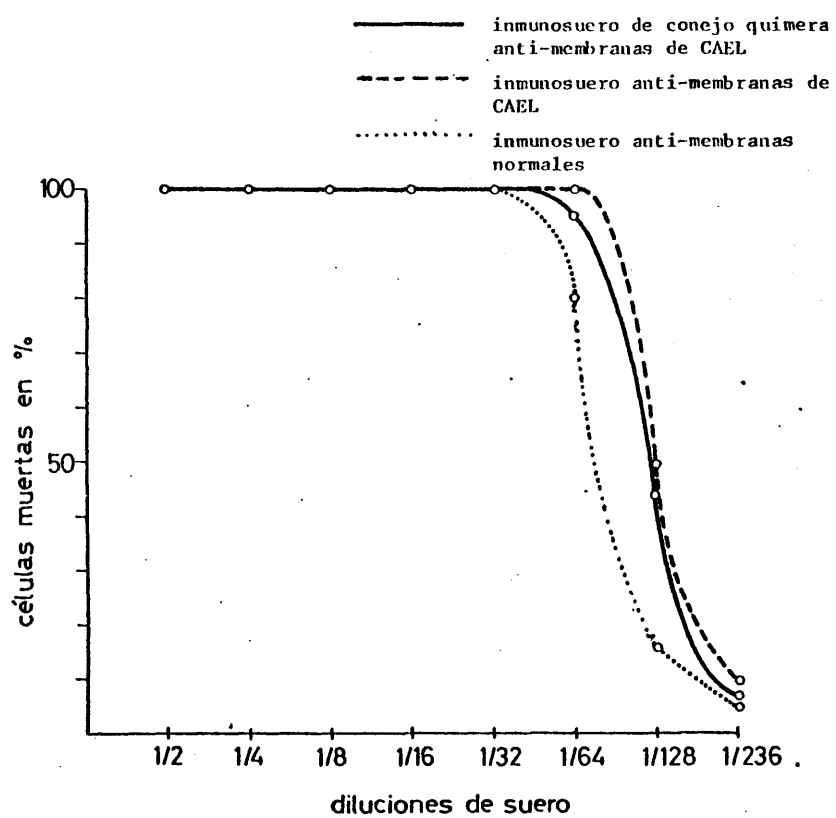


FIGURA 27

TITULACION DE LA CITOTOXICIDAD  
DE DIVERSOS ANTISUEROS SOBRE LAS CELULAS EREA

Se siguió el mismo procedimiento que en la figura 26, según se detalla en el texto. Se tomó como título del antisuero la última dilución que consiguió matar al 100 % de las células.

lidad en un número constante de células diana. Los resultados de los ensayos se recogen en la tabla XXI.

TABLA XXI

VALORACION CUALITATIVA DE LOS INMUNOSUEROS  
OBTENIDOS POR DIFERENTES PROCEDIMIENTOS

ANTISUERO	CELULAS EREA (NORMALES DE RATON)			CELULAS;LINFOCITOS (NORMALES DE RATON)			CELULAS HeLa (CANCEROSAS HUMANAS)			CELULAS CAEL (CANCEROSAS DE RATON)		
	A		D	A		D	A		D	A		D
	con C	sin C		con C	sin C		con C	sin C		con C	sin C	
I	-	++	-	-	++	-	-	-	-	-	++	-
II	-	++	-	-	++	-	-	-	-	-	++	-
III	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	++	-

I : Anti-membrana normal de ratón (inmunización tradicional).

II : Anti-membrana de CAEL (inmunización tradicional).

III : Anti-membrana de CAEL (inmunización selectiva en conejos quimera).

A : Suero sanguíneo antes de la inmunización.

D : Antisero después de la inmunización.

con C: Antisero con actividad de complemento.

sin C: Antisero inactivado por calor para inhibir el complemento.

++ : 75 a 100 % de mortalidad celular.

+

± : 25 a 50 % de mortalidad celular.

- : 0 a 25 % de mortalidad celular.

Como se recoge en la tabla XXI, los sueros de los conejos antes de la inmunización correspondiente (columnas A), no presentaron ningún efecto citotóxico sobre ninguna de las células.

Después de la inmunización los antisueros contra antígenos de ratón se mostraron activos frente a las células de ratón, pero no frente a las células humanas.

Tanto el suero anti-membrana normal de ratón como el suero anti-membrana de CAE conseguidos por inmunización tradicional, reaccionan con las células normales y cancerosas de ratón (EREA, linfocitos y CAEL).

Por su parte, el suero anti-membrana de CAEL inducido por inmunización selectiva en conejos quimera inmunológicos reacciona fuertemente con las células CAE y discretamente con las células normales de ratón.

En todos los casos la reacción depende de la presencia de complemento, como se puede ver comparando las columnas "D".

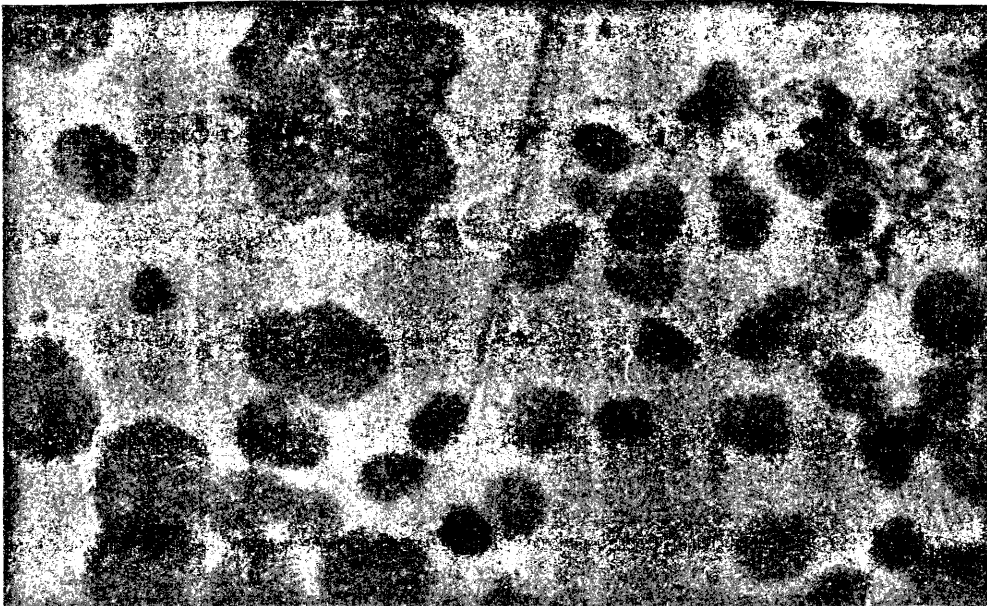
La interpretación de estos resultados será hecha en la "Discusión".

c.2. Especificidad de los anticuerpos obtenidos por inmunización selectiva de conejos quimera inmunológica.

La prueba de las inmunoperoxidasas demuestra que los antígenos específicamente anticancerosos contra las células CAEL reaccionan a nivel de la membrana celular.

En las figuras 28 y 29 una al microscopio óptico y otra al microscopio electrónico puede verse el aspecto de las células CAEL control, obtenidas tras la adición de gammaglobulinas conjugadas a peroxidasa procedentes de un conejo quimera inmunológica antes de la inmunización específica. Al microscopio óptico no se observan gránulaciones azules y al mi-

FIGURA 28



Preparación control de células CAEL al microscopio óptico.

La prueba de las inmunoperoxidasas es negativa.

FIGURA 29



Preparación control de células CAEL al microscopio electrónico. La reacción de las inmunoperoxidasas es negativa.

microscopio electrónico no se descubren regiones electrónicamente densas ajenas a la estructura celular.

Las figuras 30 y 31 corresponden a células CAEL al microscopio óptico y al microscopio electrónico, respectivamente, después de la acción de las gammaglobulinas conjugadas a peroxidasa obtenidas del conejo quimera inmunológica después de ser inmunizado con células CAEL. Al microscopio óptico se ven gránulos azules en la superficie celular y al microscopio electrónico se aprecia un borde electrónicamente denso en relación con algunas zonas de la membrana plasmática.

Por otra parte, las gammaglobulinas de conejos quimera inmunizados con antígenos de células CAEL, no afectan a las células normales de ratón en tanto que producen la destrucción de las células CAEL.

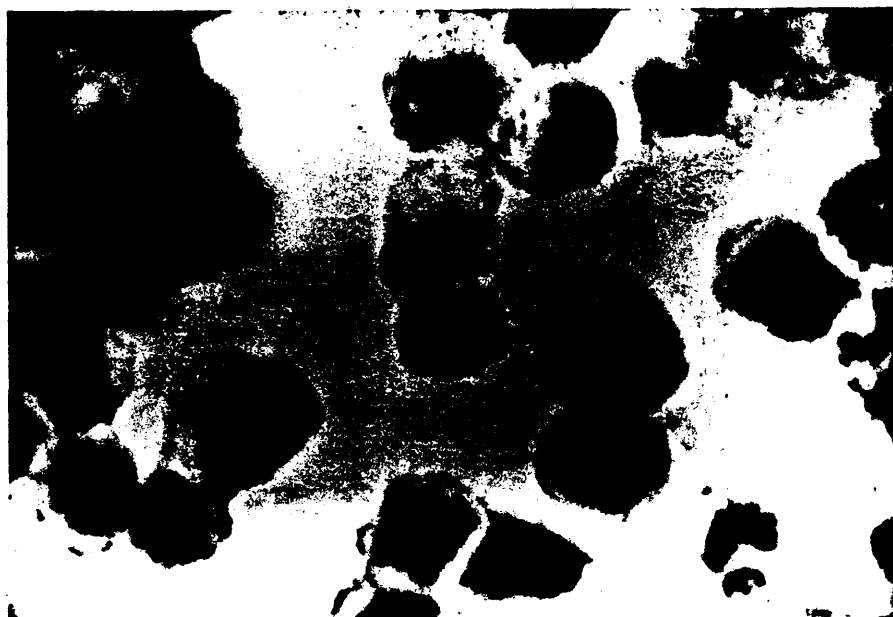
#### IV. AISLAMIENTO DE INMUNOGLOBULINAS

##### A. Ensayos previos.

Con objeto de poner a punto la técnica de obtención de inmunoglobulinas mediante cromatografía de filtración en gel de reciclo ascendente se realizaron varios experimentos utilizando columnas de distintos tamaños y diferentes volúmenes de suero de partida.

Prueba 1 (reciclo discontinuo de 3 ml de suero en columna K 26/40): se utilizó una columna K 26/40 de Pharmacia Fine Chemicals, de 2,6 cm de diámetro y 40 cm de altura, con un volumen de lecho de 180 ml. Se montó como se indica en el apartado de "Material y Métodos" (figura 5), y se cargaron 3 ml de suero pretratado (inactivado, concentrado y dializado). Los

FIGURA 30



En esta preparación de células CAEL al microscopio óptico se puede observar la reacción entre las  $\gamma$ -globulinas conjugadas a peroxidasas y los antígenos de la superficie celular, gracias a la coloración azul que proporciona la reacción histoquímica. Los gránulos de la reacción de la inmunoperoxidasas no se distribuyen homogéneamente, apareciendo zonas de membrana libres de antígenos oncoasociados.



FIGURA 31

En esta célula CAEL observada al microscopio electrónico se puede ver la reacción positiva de las inmunoperoxidasas por un reborde de gránulos electrónicamente densos a lo largo de la membrana celular. La cantidad de antígenos oncoasociados ofrece una concentración variable en los distintos puntos de la membrana.

resultados se registran en la figura 32, en la que aparecen 3 picos, 2 de ellos solapados y un tercero bien diferenciado. Se recogieron los picos 1 y 2 conjuntamente y el 3 por separado; se concentraron y se introdujeron nuevamente en la columna. La figura 33 muestra el segundo paso de los picos 1 y 2 mancomunados, en el que apenas se aprecia la contaminación por el pico 3. Se recogieron otra vez las fracciones correspondientes al nuevo complejo 1 + 2 y se volvieron a introducir en la columna, dando lugar a la figura 34.

Por su parte, el pico 3 de la primera columna (figura 32) se volvió a pasar dando lugar a los resultados de la figura 35.

Prueba 2 (reciclo continuo de 3 ml de suero en columna K 26/40): se utilizó la misma columna de la prueba 1. Se introdujeron también 3 ml de suero, pero esta vez se pasó en reciclo continuo obteniéndose los resultados de la figura 36.

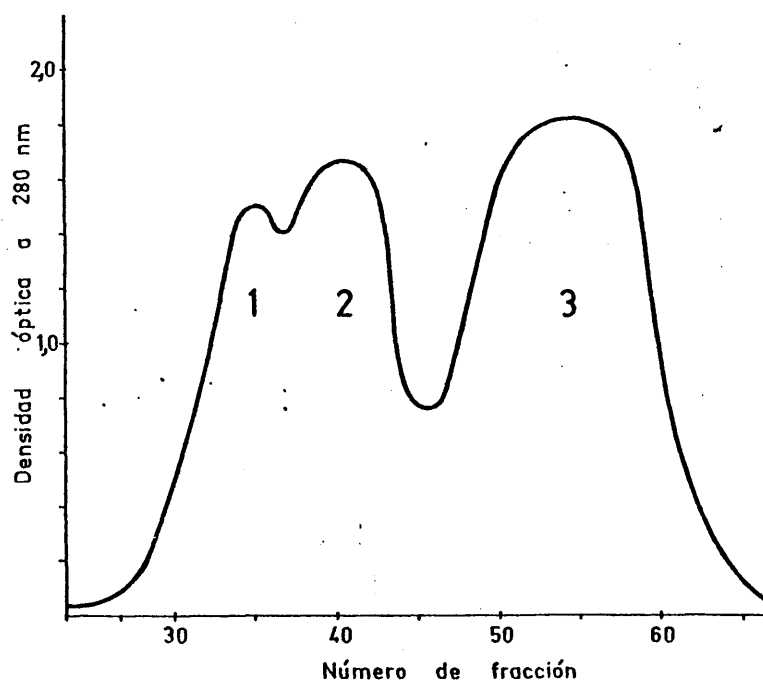
Después del primer paso (I) se obtienen los picos 1, 2 y 3, equivalentes y con las mismas características de los obtenidos en la figura 32. Tras el segundo paso (II) salen sucesivamente los picos 1 y 2, solapados como siempre, pero el pico 3 no alcanza a salir, haciéndolo al principio del tercer paso (III), con lo cual se superpone a los picos 1 y 2, que aparecen a continuación.

Es evidente que el reciclo continuo consigue peores resultados de separación que el reciclo discontinuo.

Prueba 3 (reciclo discontinuo de 9 ml de suero en columna K 26/40): haciendo uso del mismo tipo de columna de los casos anteriores se introdujeron esta vez 9 ml de suero. La figura 37 muestra los resultados obtenidos,

FIGURA 32

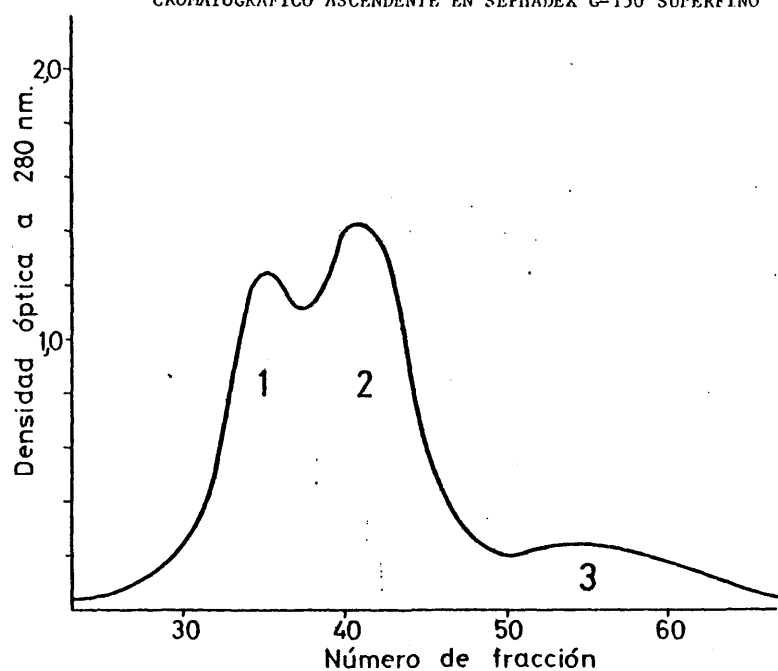
PERFIL DE ELUCION DE PROTEINAS POR RECICLO  
CROMATOGRAFICO ASCENDENTE EN SEPHADEX G-150 SUPERFINO



El perfil de elución de las proteínas de suero de conejo de esta curva corresponde al primer paso por una columna de Sephadex G-150 superfino. Se aplicó una muestra de 3 ml previamente concentrada hasta 1 ml en una columna con unas dimensiones de 2,6 x 40 cm. Las proteínas fueron eluidas con buffer fosfato 0,05 M en ClNa 0,1 M a pH 6,9.

FIGURA 33

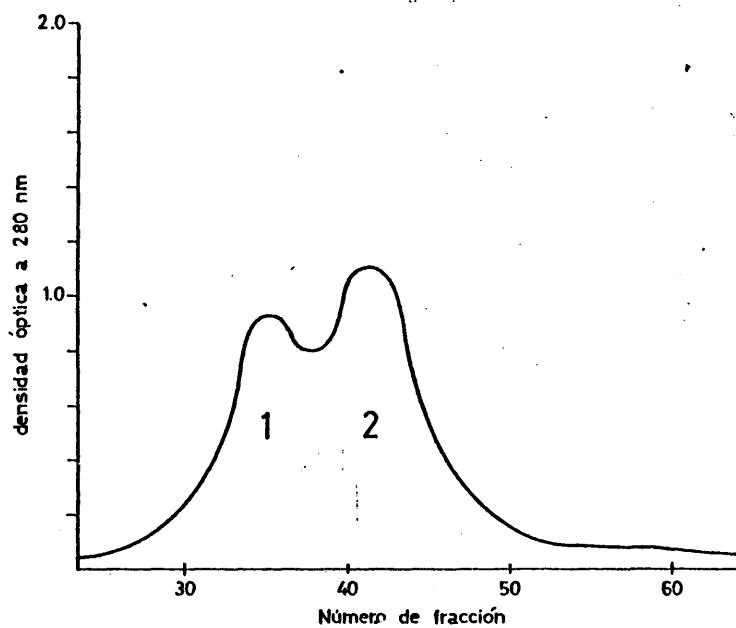
PERFIL DE ELUCION DE PROTEINAS POR RECICLO  
CROMATOGRAFICO ASCENDENTE EN SEPHADEX G-150 SUPERFINO



El perfil de elución de las proteínas de suero de conejo de esta curva corresponde segundo paso por una columna de Sephadex G-150 superfino. Se aplicó como muestra los picos 1 y 2 del primer paso, concentrados hasta un volumen de 1 ml en una columna con unas dimensiones de 2,6 x 40 cm. Las proteínas fueron eluidas con buffer fosfato 0,05 M en ClNa 0,1 M pH 6,9.

FIGURA 34

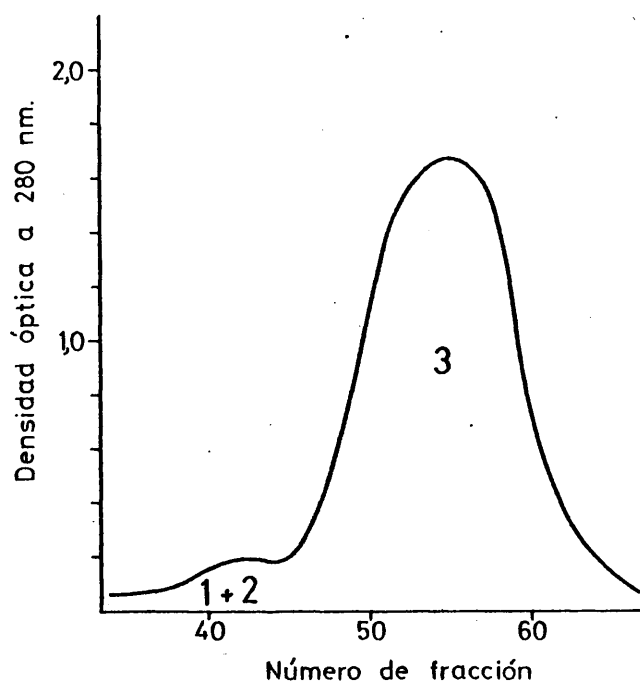
PERFIL DE ELUCION DE PROTEINAS POR RECICLO  
CROMATOGRAFICO ASCENDENTE EN SEPHADEX G-150 SUPERFINO



El perfil de elución de las proteínas de suero de conejo obtenido después del tercer paso por una columna de Sephadex G-150 superfino. Se aplicó como muestra los picos 1 y 2 del segundo paso, concentrados hasta un volumen de 1 ml, en una columna de 2,6 x 40 cm. Las proteínas fueron eluidas con buffer fosfato 0,05 M en ClNa 0,1 M pH. 6,9.

FIGURA 35

PERFIL DE ELUCIÓN DE PROTEÍNAS POR RECICLO  
CROMATOGRÁFICO ASCENDENTE EN SEPHADEX G-150 SUPERFINO



Perfil de elución de proteínas de suero de conejo obtenidas después del segundo paso por una columna de Sephadex G-150 superfino. Se aplicó como muestra el pico 3 del primer paso concentrado hasta un volumen de 1 ml, en una columna con unas dimensiones de 2,6 x 40 cm. Las proteínas fueron eluidas con buffer fosfato 0,05 M en ClNa 0,1 M pH 6,9.

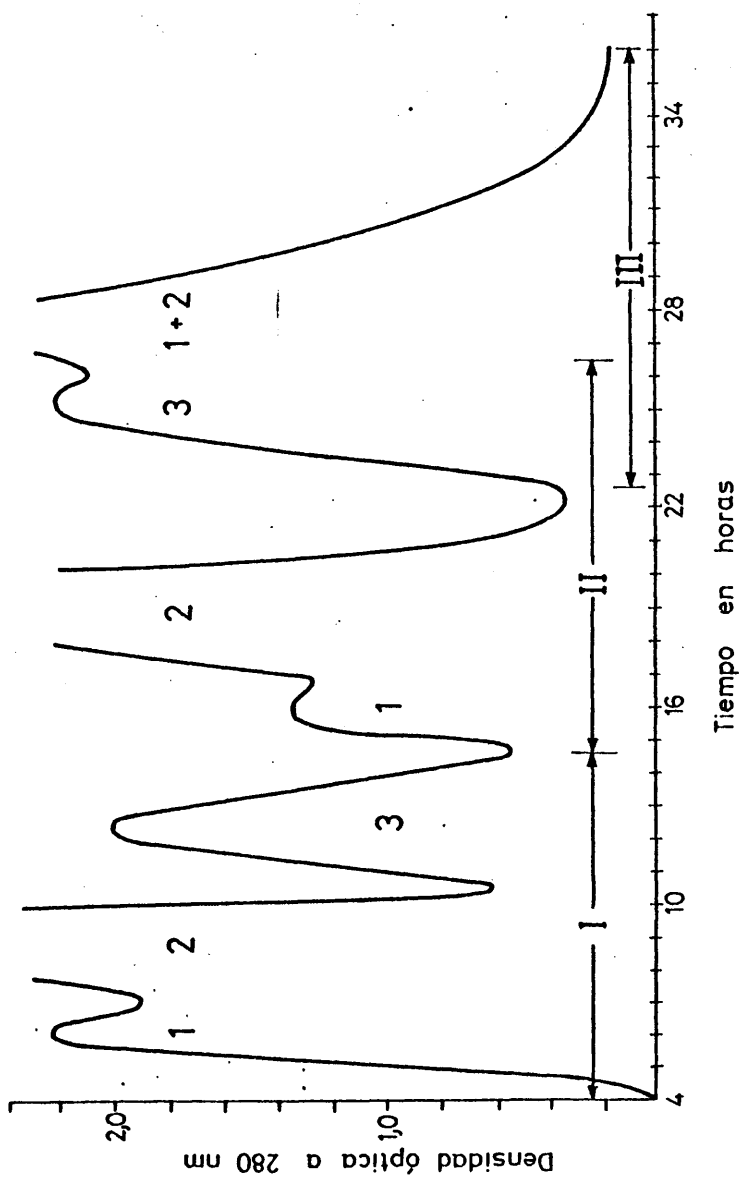


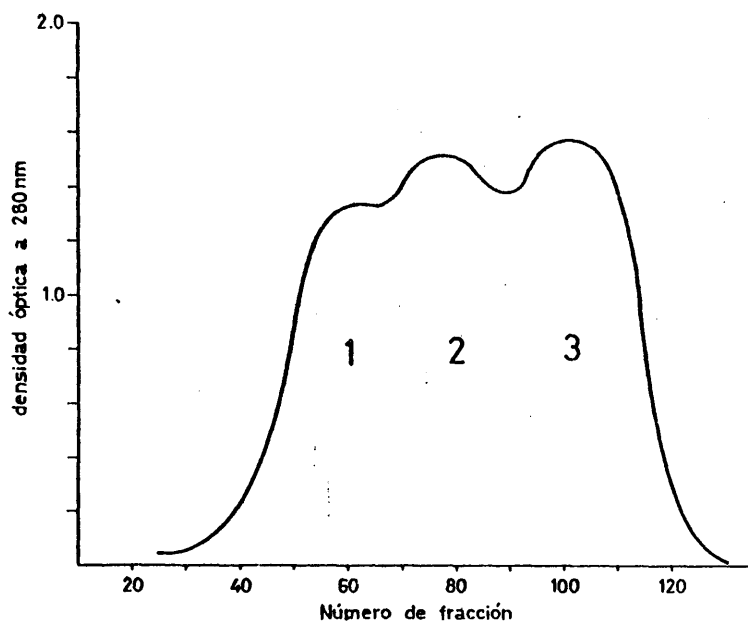
FIGURA 36

PERFIL DE ELUCION DE PROTEINAS POR RECICLO CROMATOGRAFICO ASCENDENTE EN SEPHADEX G-150 SUPERFINO

Perfil de elución de 3 ml de suero sometidos a reciclo continuo.

FIGURA 37

PERFIL DE ELUCIÓN DE PROTEÍNAS POR RECICLO  
CROMATOGRÁFICO ASCENDENTE EN SEPHADEX G-150 SUPERFINO



Perfil de elución de proteínas de suero de conejo obtenido después del primer paso por una columna de Sephadex G-150 superfino. Se aplicó como muestra 9 ml de suero de conejo concentrados hasta 3 ml en una columna de 2,6 x 40 cm. Las proteínas fueron eluidas con buffer fosfato 0,05 M en ClNa 0,1 M pH 6,9. La lectura de absorción se hizo diluyendo las fracciones 1/10 con el buffer de elución.



los cuales indican que la columna K 26/40 es demasiado pequeña para poder resolver los picos del volumen de suero añadido, aunque se haga un segundo paso, como señala la figura 38 apareciendo solapados los picos 1, 2 y 3.

Prueba 4 (paso único de 3 ml de suero en columna K 26/100): para este ensayo se utilizó una columna K 26/100, del mismo diámetro que la anterior pero de 100 cm de altura, con un volumen de lecho de 480 ml. Se introdujeron también 3 ml de suero y con un solo paso se obtuvo una resolución total, como se refleja en la figura 39.

Prueba 5 (reciclo discontinuo de 9 ml de suero en columna K 26/100): se utilizó la columna K 26/100, introduciendo en ella 9 ml de suero. La gráfica del primer paso, figura 40, nos muestra la aparición de tres picos, el 1 y el 2 solapados y el tercero aparte. Se toman los picos 1 y 2 conjuntamente y se pasan nuevamente por la columna, apareciendo mucho menos superpuestos los picos 1 y 2 que, además, tienen muy poca contaminación del material del pico 3, que se adentra ligeramente en la cola del pico 2 (figura 41).

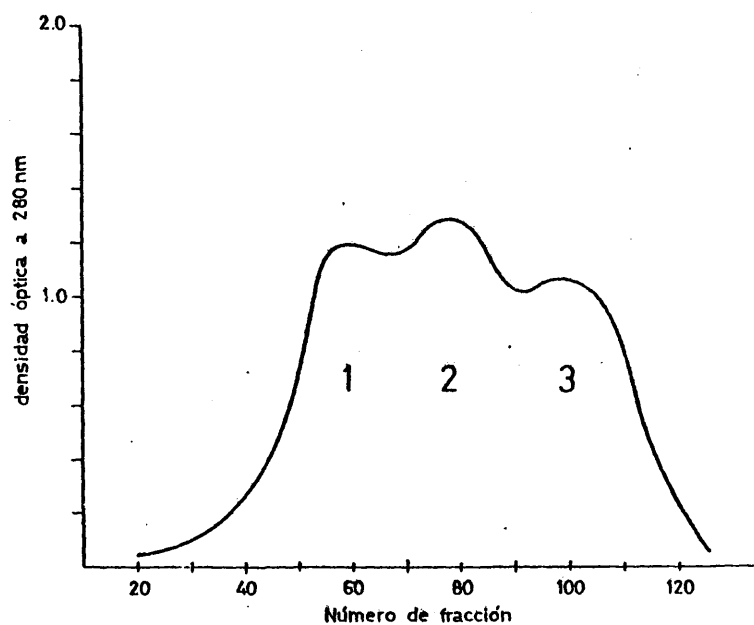
El mancomunado de los picos 1 y 2 se volvió a pasar por la columna obteniéndose la gráfica de la figura 42, en la que los picos 1 y 2 que, como se verá, están compuestos por inmunoglobulinas, quedan separados totalmente del pico 3, compuesto por albúminas, según se comprobó ulteriormente.

#### B. Resultados.

En ningún caso se consiguieron resolver totalmente los picos 1 y 2, aunque quedaron razonablemente separados en la prueba 4, que corresponden

FIGURA 38

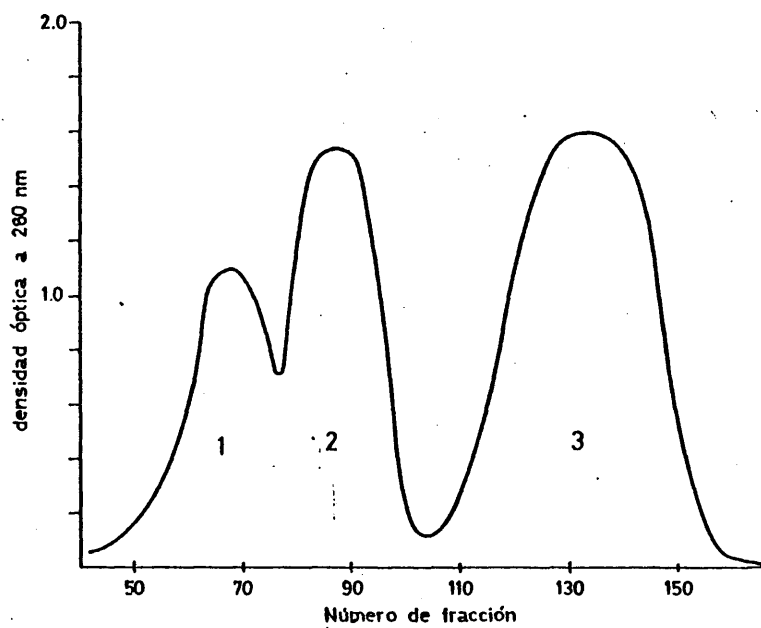
PERFIL DE ELUCION DE PROTEINAS POR RECICLO  
CROMATOGRAFICO ASCENDENTE EN SEPHADEX G-150 SUPERFINO



Perfil de elución de proteínas de suero de conejo obtenido después del segundo paso por una columna de Sephadex G-150 superfino. Se aplicó como muestra los picos 1 y 2 del primer paso concentrado hasta 3 ml, en una columna de 2,6 x 40 cm. Las proteínas fueron eluidas con buffer fosfato 0,05 M en ClNa 0,1 M pH 6,9. La lectura de absorción se hizo diluyendo la muestra se hizo diluyendo la muestra 1/10 con el buffer de elución.

FIGURA 39

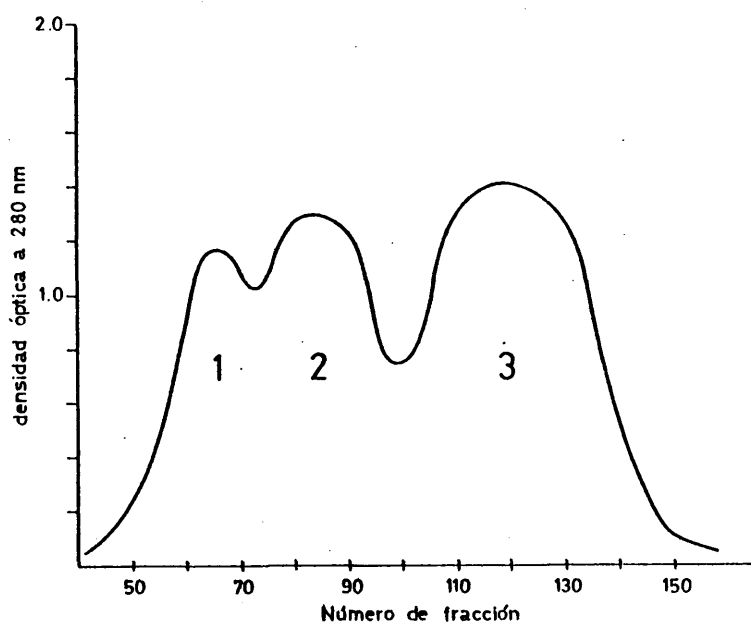
PERFIL DE ELUCION DE PROTEINAS POR RECICLO  
CROMATOGRAFICO ASCENDENTE EN SEPHADEX G-150 SUPERFINO



Perfil de elución de proteínas de suero de conejo obtenido después del primer paso por una columna de Sephadex G-150 superfino. Se aplicó como muestra 3 ml de suero de conejo concentrado a 1 ml, en una columna de 2,6 x 100 cm. Las proteínas fueron eluidas con buffer fosfato 0,05 M en ClNa 0,1 M pH 6,9.

FIGURA 40

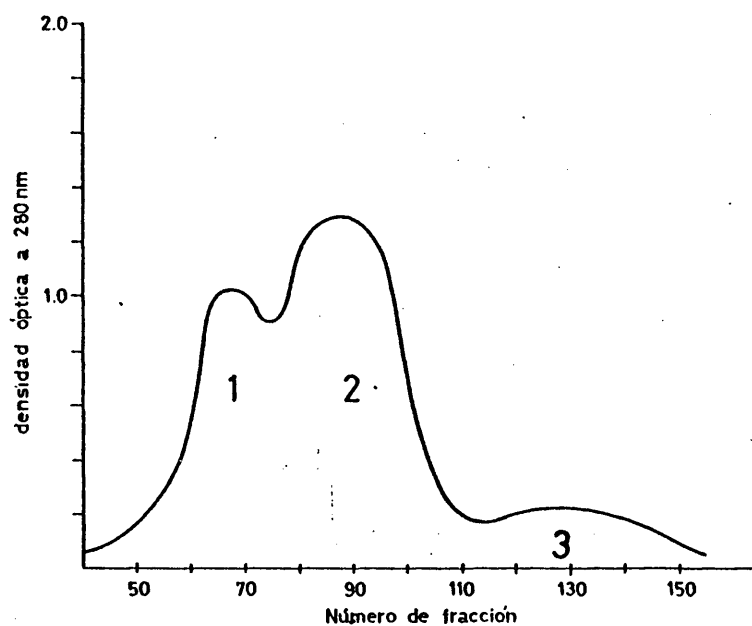
PERFIL DE ELUCION DE PROTEINAS POR RECICLO  
CROMATOGRAFICO ASCENDENTE EN SEPHADEX G-150 SUPERFINO



Perfil del elución de proteínas de suero de conejo obtenido después del primer paso por una columna de Sephadex G-150 superfino. Se aplicó como muestra 9 ml de suero de conejo concentrado a 3 ml, en una columna de 2,6 x 100 cm. Las proteínas fueron eluidas con buffer fosfato 0,05 M en ClNa 0,1 M pH 6,9. La lectura de absorción se hizo diluyendo las fracciones 1/10 con el buffer de elución.

FIGURA 41

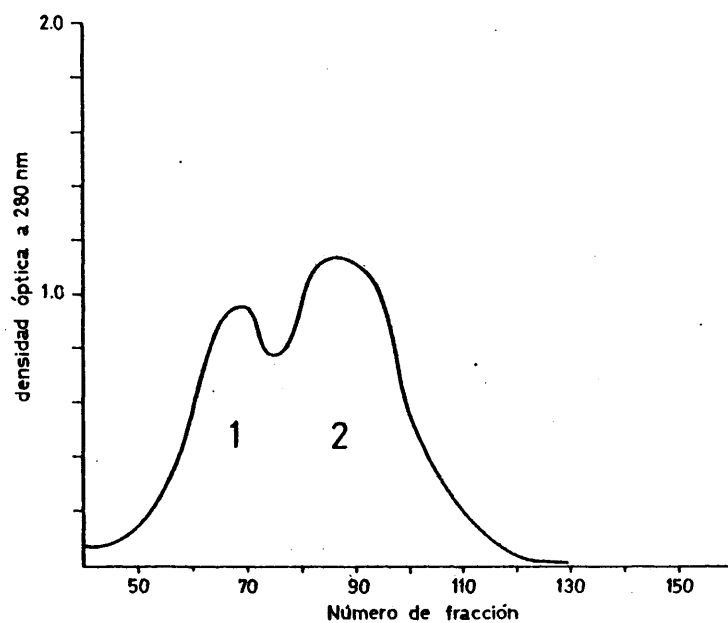
PERFIL DE ELUCION DE PROTEINAS POR RECICLO  
CROMATOGRAFICO ASCENDENTE EN SEPHADEX G-150 SUPERFINO



Perfil de elución de proteínas de suero de conejo obtenido después del segundo paso por una columna de Sephadex G-150 superfino. Se aplicó como muestra los picos 1 y 2 del primer paso concentrado hasta un volumen de 3 ml, en una columna con unas dimensiones de 2,6 x 100 cm. Las proteínas fueron eluidas con buffer fosfato 0,05 M en ClNa 0,1 M pH 6,9. La lectura de absorción se realizó haciendo dilución 1/10 de las fracciones con el buffer de elución.

FIGURA 42

PERFIL DE ELUCION DE PROTEINAS POR RECICLO  
CROMATOGRAFICO ASCENDENTE EN SEPHADEX G-150 SUPERFINO



Perfil de elución de proteínas de suero de conejo obtenidas después del tercer paso por una columna de Sephadex G-150 superfino. Se aplicó como muestra los picos 1 y 2 del segundo paso concentrado hasta un volumen de 3 ml, en una columna con unas dimensiones de 2,6 x 100 cm. Las proteínas fueron eluidas con buffer fosfato 0,05 M en ClNa 0,1 M pH 6,9. La lectura de absorción se hizo diluyendo las fracciones 1/10 con el buffer de elución.

a inmunoglobulinas M y G respectivamente.

Para reconocer la naturaleza de los picos y la existencia o no de contaminación, se procedió a realizar una inmunolectroforesis de los mismos. Esto permitió deducir que el pico 1 son IgM, el pico 2 IgG y el pico 3 albúminas.

Para calcular la pureza de las gammaglobulinas obtenidas utilizamos también el índice característico que se obtiene dividiendo la densidad óptica de las fracciones obtenida a 278 nm y a 251 nm, que para las gammaglobulinas humanas es del orden de 2,8 y para las de conejo 2,7-2,6.

En el caso de las inmunoglobulinas antimembrana se probó si con la purificación se producía pérdida de la actividad biológica, viéndose que no se pierde la actividad citotóxica si se añade complemento a las inmunoglobulinas cuando se ponen en presencia de las células.

La concentración del suero o de las fracciones mancomunadas en los distintos pasos supone una pérdida de material del orden del 2 al 4 %. Cada paso por la columna supone una pérdida del orden del 10 % de las proteínas cargadas cada vez.

## V. OBTENCION DE ANTIGENOS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

### A. Pruebas previas.

#### A.1. Estudio de la desnaturalización del ligando.

Debido a que la técnica de la cromatografía de afinidad aplicada a la separación de antígenos específicos implica el cambio de pH neutro (7,0) a pH ácido (2,8), es necesario saber si las inmunoglobulinas que ac-

túan como ligando fijadas a la Sepharosa se desnaturalizan con varios cambios de pH inutilizando la columna para extracciones sucesivas.

Al efecto se incubaron inmunoglobulinas anti-peroxidasas a pH ácido durante 10 minutos, se neutralizaron y se repitió el proceso varias veces para comprobar si, en caso de utilizarse como ligando, la columna era reutilizable. Después de cada cambio de pH se tomó una muestra y se hizo una inmunodifusión, observándose que después de 4 cambios de pH el título del antisuero había pasado de 1/16 a 1/8, indicio de cierto grado de desnaturalización.

El mismo experimento se realizó invirtiendo el sistema y considerando a las peroxidasas como supuesto ligando. En este caso se vio que no había desnaturalización, al menos en cuanto a su antigenicidad se refiere.

#### A.2. Fijación de proteínas a Sepharosa 4B activada con CNBr.

Se ofertaron para su conjugación al gel distintas cantidades de inmunoglobulinas para calcular los requisitos para la fijación del ligando. Los resultados se muestran en la tabla XXII y la figura 43 para una columna de 5 ml de Sepharosa 4B (CNBr). En función de la misma, para los experimentos posteriores se eligió ofertar 30 mg, con lo que se obtiene una buena fijación. Una oferta excesiva de sustancia puede acarrear problemas por impedimento estérico.

### B. Experimentos control.

#### B.1. Sistema peroxidasas/anticuerpos antiperoxidasas.

Para la puesta a punto de la cromatografía de afinidad se empleó el sistema peroxidasas-antiperoxidasas.

Este sistema es fácil de analizar con objeto de calcular rendimien-



tos y formas de elusión. Permite utilizar en la inmunización de los conejos una proteína pura, fácil de detectar por inmunodifusión e incluso por análisis enzimáticos.

TABLA XXII

FIJACION DE PROTEINAS A SEPHAROSA 4B ACTIVADA CON CNBr

VOLUMEN DE SEPHAROSA 4B (CNBr) ml	PROTEINA AÑADIDA mg	PROTEINA FIJADA mg	EFICACIA % DE PROTEINA FIJADA
5	5	4,5	95
5	15	14	93
5	30	27	90
5	60	48	80

Las pruebas en conjunto se agrupan en dos modelos, según el ligando utilizado:

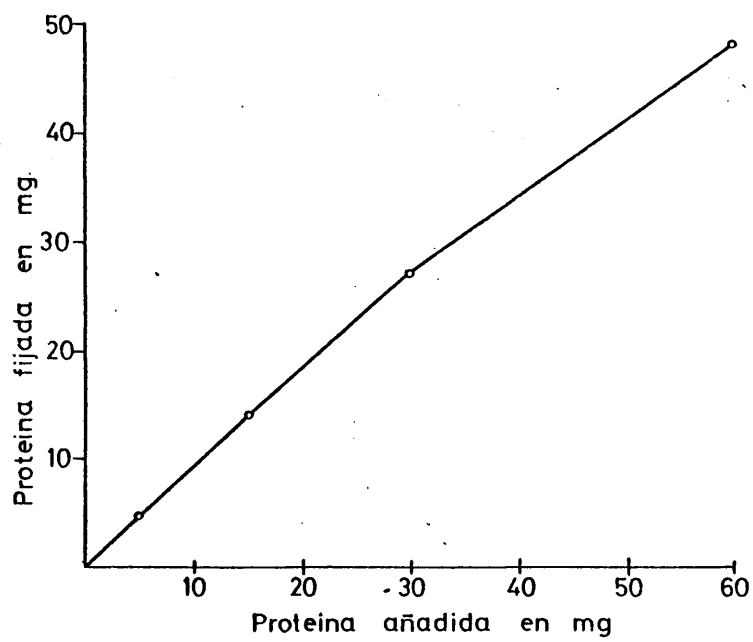
Modelo I: Sepharosa-peroxidasas, que utiliza el antígeno como ligando.

Se conjugan peroxidasas a Sepharosa y después se hace pasar antisuero anti-peroxidasas de conejo o inmunoglobulinas previamente purificadas.

Modelo II: Sepharosa-inmunoglobulinas anti-peroxidasas, que emplea el anticuerpo como ligando.

FIGURA 43

FIJACION DE PROTEINAS A SEPHAROSA 4B (CNBr)



Relación entre las proteínas añadidas a 5 ml de Sepharosa 4B (CNBr) y las proteínas fijadas como ligando.

Se conjugan las inmunoglobulinas y se ofertan las peroxidasas solas o mezcladas con otras proteínas para ver la especificidad de la reacción.

a) Conjugación de proteínas a Sepharosa 4B (CNBr).

La conjugación de proteínas a Sepharosa, sean peroxidasas o inmunoglobulinas, se realiza por el procedimiento habitual ya descrito.

Hasta su utilización, las columnas se guardan a 10°C en azida sódica 0,1 %.

b) Oferta del antígeno o anticuerpo.

En todos los casos se realiza la oferta en reciclo con la ayuda de una bomba peristáltica para mantener el flujo constante.

El lavado de la columna se realiza con buffer NaCl 0,14 M y Tris 20 mM, pH 7,4 y la elución con buffer glicina 0,2 M pH 2,8.

c) Aislamiento de inmunoglobulinas en el modelo I.

c.1) Utilizando una concentración de peroxidasas de 0,4 mg/ml de gel.

Conjugación de peroxidasas a Sepharosa 4B (CNBr).

1. Se pesan 3,0 g de Sepharosa 4B (CNBr), que proporcionan un volumen de gel de 10 ml.

2. Se ofertan 5,0 mg de peroxidasas (2,5 mg/ml). El análisis del producto no fijado indica que se fijan 4,3 mg, equivalente a un rendimiento de 86 %.

3. El complejo gel-ligando se reparte en dos columnas iguales de 5 ml de Sepharosa 4B (CNBr) con 2,15 mg de peroxidasas.

Oferta de proteínas.

1. A una de las dos columnas se le oferta un suero control,

condiciones en las cuales no ha de haber fijación específica.

2. La otra columna recibe la oferta de un inmunosero anti-peroxidasas, que deberá producir una conjugación específica con las inmunoglobulinas específicas.

3. Se ofertan 0,1, 0,5, 1,0 y 5,0 ml de suero, tanto control como específico, en un volumen final de 10 ml, haciendo la dilución en buffer NaCl 0,14 M Tris 20 mM pH 7,4.

4. Se lavan con buffer NaCl pH 7,4.

5. Se eluyen con buffer glicina pH 2,8.

6. Una vez realizadas las 4 ofertas y la elusión ácida con glicina en cada columna, se lavan con buffer glicina al que se le ha añadido 10 % de dioxán, con lo que se obtienen las proteínas que habían quedado unidas fuertemente.

7. Después se oferta a cada una de las columnas 1 ml de anti-suero específico, eluyendo sucesivamente con glicina y glicina-dioxán, calculando el porcentaje de proteínas que se eluyen con una sola oferta de dioxán.

A efectos de reutilización de la columna, conviene comprobar que la columna no se ha desnaturalizado porque fija las cantidades calculadas de ligando.

Los resultados obtenidos están resumidos en las tablas XXIII a XXV. En la figura 44 se recogen gráficamente los resultados de la tabla XXIV. La tabla XXV-A y la figura 44a hacen referencia a las características comparadas de las inmunoglobulinas eluidas con glicina sola y con glicina-dioxán.

TABLA XXIII

COLUMNA DE SEPHAROSA 4B (CNBr)-PEROXIDASAS

OFERTA DE SUERO CONTROL

VOLUMEN DE SUERO	CANTIDAD DE PROTEINAS OFERTADAS	CANTIDAD DE PROTEINAS ELUIDAS	FIJACION EN %
ml	mg	µg	
0,1	6,8	38	0,5
0,5	34	41	0,12
1,0	68	65	0,096
5,0	340	330	0,097

TABLA XXIV

COLUMNA DE SEPHAROSA 4B (CNBr)-PEROXIDASAS

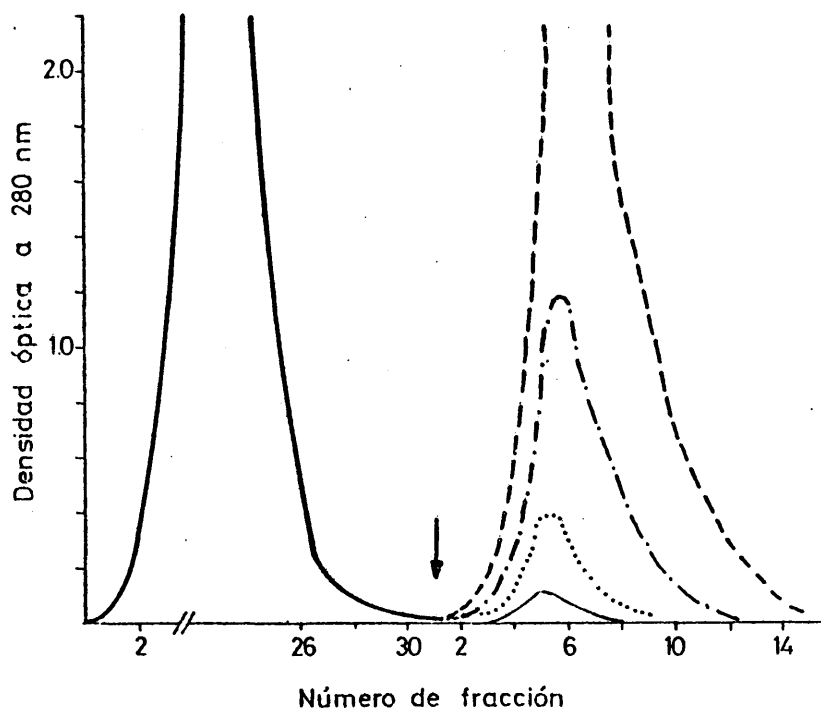
OFERTA DE ANTISUERO ESPECIFICO

VOLUMEN DE SUERO	CANTIDAD DE PROTEINAS OFERTADAS	CANTIDAD TEORICA DE PROTEINAS ELUIDIBLES (*) µg	CANTIDAD REAL DE PROTEINAS ELUIDAS µg	FIJACION EN %	
mg	mg			REAL/TEORI- CO	REAL/OFER- TADO
0,1	6,7	134	54	40	0,8
0,5	33,5	670	209	31	0,62
1,0	67	1340	372	28	0,56
5,0	335	6700	2760	41	0,82
1,0	67	1340	690	51	1,02
1,0	67	1340	700	52	1,04

(\*) Valor teórico máximo calculado a partir del punto de equivalencia, que corresponde al 2 % de las proteínas del suero y al 20 % de las gamma-globulinas.

FIGURA 44

CROMATOGRÁFIA DE AFINIDAD  
ENTRE PEROXIDASAS Y ANTISUERO ANTI-PEROXIDASAS



Aislamiento de anticuerpos usando como ligando antígenos fijados a Sepharosa 4B (CNBr). Se utilizó una columna de 5 ml de gel en la que se habían conjugado 2 mg de peroxidasas y se ofertaron distintos volúmenes de inmunosero anti-peroxidasas. La flecha indica el punto en que se empieza a añadir el buffer ácido.

- oferta de 0,1 ml de antisuero
- ..... oferta de 0,5 ml de antisuero
- . - . - oferta de 1,0 ml de antisuero
- oferta de 5,0 ml de antisuero

Con objeto de comprobar la existencia de inmunoperoxidasas en el material eluido, las proteínas obtenidas de 5,0 ml de volumen de suero (tabla XXIV) se concentraron hasta 1,0 mg/ml y se sometieron a una inmunodifusión, comprobando que la actividad de anticuerpos antiperoxidasas era seis veces mayor.

TABLA XXV

RENDIMIENTO DE LA ELISION CON GLICINA + 10 % DE DIOXAN

PROTEINAS TOTALES ELUIDAS µg	PROTEINAS ELUIDAS POR EL DIOXAN µg	PORCENTAJE DE PROTEINAS ELUIDAS POR EL DIOXAN
3395	936	27
983	293	30
960	260	27

c.2) Utilizando una concentración de peroxidasas de 2 mg/ml de gel.

Conjugación de peroxidasas a Sepharosa 4B (CNBr).

Para un volumen de lecho de 5 ml se conjugan 10 mg de peroxidasa en una concentración de 5 mg/ml con un rendimiento de conjugación de 94 %.

Oferta de proteínas.

Se ofertan 0,1, 0,5, 1 y 5 ml de antisuero antiperoxi-

TABLA XXV-A

CARACTERISTICAS COMPARADAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS ELIDIDAS  
CON GLICINA SOLA Y CON GLICINA-DIOSAN

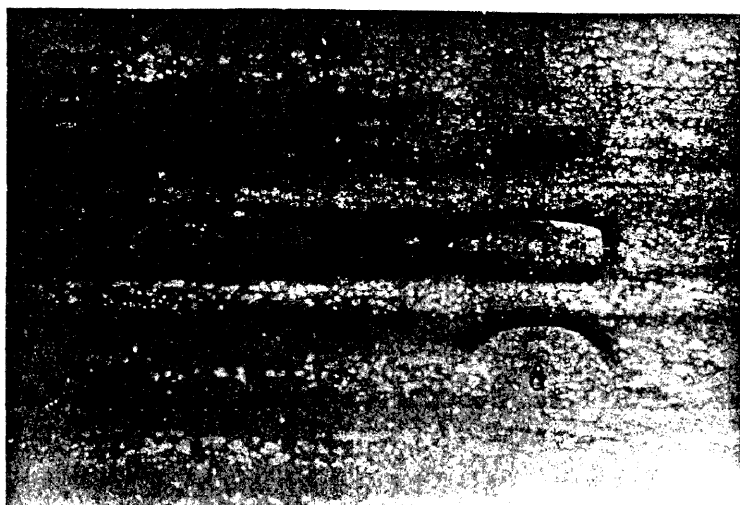
	% DEL TOTAL DE Ig	% DEL TOTAL ELIDIDO	ESTABILIDAD DE ENLACE	REACTIVIDAD DESPUES DE LA ELISION (*)	RECONOCI- MIENTO (**)
Ig ELIDIDAS CON GLICINA	10	60 - 85	menor	buena	bueno
Ig ELIDIDAS CON GLICINA	6	15 - 40	mayor	mala	malo

(\*) Valorada por inmunodifusión contra peroxidasas.

(\*\*) Valorado por inmunoelectroforesis del material elidido expuesto a anti-suero contra suero de conejo. Las Ig eluidas solo con glicina dan una banda nítida en tanto que las Ig eluidas con glicina-dioxán producen una banda difusa, aunque de idéntica movilidad eléctrica, como se aprecia en la figura 44a.

FIGURA 44a

INMUNOELECTROFORESIS DE LAS INMUNOGLOBULINAS ELIDIDAS  
CON GLICINA Y CON GLICINA-DIOXÁN



Esta inmunoelectroforesis de un antisuero contra suero de conejo, donde se aprecia la separación de las diversas seroproteínas, sirve de control para las bandas de precipitación obtenidas por elusión con glicina solamente (G) y con glicina-dioxán (GD). Dichas bandas corresponden a inmunoglobulinas G.



dasas. En todos los casos se lava con NaCl-Tris pH 7,4 y se eluye con glicina-HCl pH 2,8.

La oferta se hace siempre en reciclo continuo y se mantiene un volumen constante de 10 ml en el buffer de lavado.

Los resultados se resumen en la tabla XXVI y la figura

45.

TABLA XXVI

FIJACION DE INMUNOGLOBULINAS ANTI-PEROXIDASAS

A SEPHAROSA 4B (CNBr)

VOLUMEN DE SUERO	CANTIDAD DE PROTEINAS OFERTADAS	CANTIDAD TEORICA DE PROTEINAS ELUIBLES (*) $\mu$ g	CANTIDAD REAL DE PROTEINAS ELUIDAS $\mu$ g	FIJACION EN %	
				REAL/TEORICO	REAL/OFER- TADO
ml	mg				
0,1	6,7	134	130	97	1,94
0,5	33,5	670	623	93	1,86
1,0	67	1340	1120	83,5	1,79
5,0	335	6700	5100	76	1,52

(\*) Valor teórico máximo calculado a partir del punto de equivalencia, que corresponde al 2 % de las proteínas del suero y al 20 % de las gammaglobulinas.

d) Aislamiento de antígenos en el modelo II.

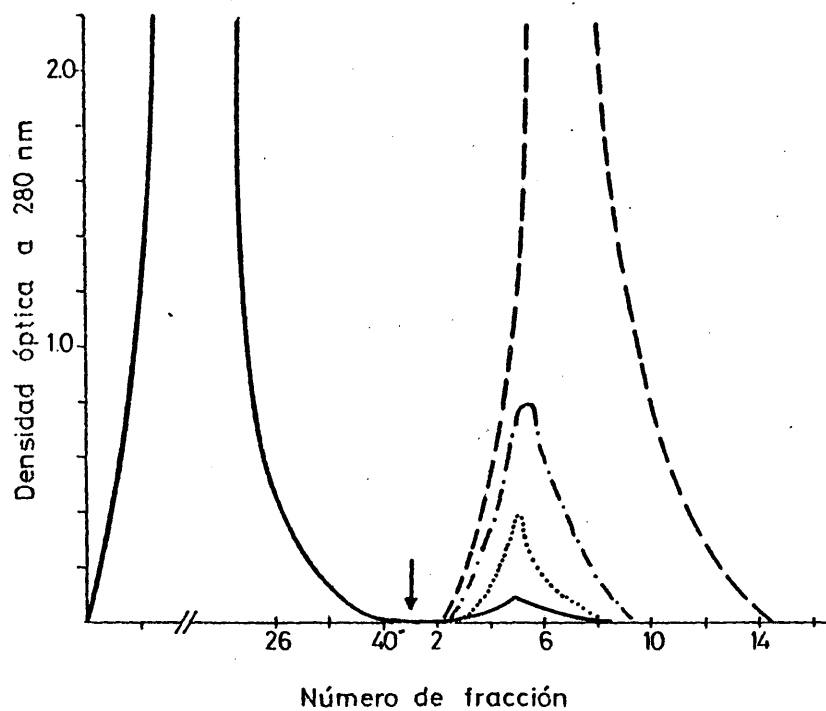
d.1) Variación de la concentración de las inmunoglobulinas cargadas en Sepharosa 4B (CNBr).

Conjugación de inmunoperoxidasas a Sepharosa 4B (CNBr).

Utilizando un volumen constante de gel de 5 ml se conjugan separadamente tres concentraciones de anticuerpos, 15, 30 y 60 mg res-

FIGURA 45

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD  
ENTRE PEROXIDASAS Y ANTISUERO ANTI-PEROXIDASAS



Aislamiento de anticuerpos usando como ligando antígenos fijados a Sepharosa 4B (CNBr). Se utilizó una columna de 5 ml de gel en la que se habían conjugado 10 mg de peroxidasas y se ofertaron distintos volúmenes de inmunosero anti-peroxidasas. La flecha indica el punto en que se empieza añadir el buffer ácido.

- oferta de 0,1 ml de antisuero
- ..... oferta de 0,5 ml de antisuero
- oferta de 1,0 ml de antisuero
- oferta de 5,0 ml de antisuero

pectivamente, lo que representa una concentración de 3,6 y 12 mg de Ig/ml de Sepharosa.

Oferta de proteínas.

Se realizan en cada columna 2 ofertas, la primera de peroxidases con suero de un conejo control para comprobar la especificidad y la segunda de peroxidases solamente para ver rendimientos.

En todos los casos se oferta 1 mg de peroxidases, en 10 ml de NaCl 0,14 M Tris 20 mM pH 7,4, que es cantidad suficiente ya que, según las relaciones óptimas, en el punto de equivalencia reaccionan 37,5 µg de peroxidases con 2,5 mg de inmunoglobulinas; por tanto 1 mg de peroxidases reaccionaría con 66,6 mg de inmunoglobulinas.

Se lava el gel con el mismo buffer y se eluyen los antígenos (peroxidases) con glicina-HCl 0,2 M pH 2,8 y a continuación con glicina-HCl 0,2 M + 10 % de dioxán.

Los resultados obtenidos se resumen en las figuras 46 a 48, que corresponden a los experimentos realizados utilizando concentraciones de 3, 6 y 12 mg de Ig/ml de gel, así como en las tablas XXVII y XXVIII.

d.2) Variación del volumen de lecho para la concentración menor de inmunoglobulinas (3 mg de Ig/ml de gel).

Conjugación de inmunoperoxidasas a Sepharosa 4B (CNBr).

Se conjugan 105 mg de inmunoglobulinas a 35 ml de Sepharosa y se reparten en tres columnas de 5, 10 y 20 ml respectivamente.

Oferta de proteínas.

Se realiza exactamente igual que en el apartado d.1. Los lavados y las eluciones también se llevan a cabo de la misma manera.

Los resultados obtenidos se resumen en las figuras 46 a 50

y en las tablas XXIX y XXX. La especificidad de la reacción se comprobó espectrofotométricamente (figuras 50a y 50b).

TABLA XXVII

VARIACION DE LA CONCENTRACION DE Ig

OFERTA	CONCENTRACION Ig/ml SEPHAROSA	CANTIDAD TEORICA MAXIMA µg	CANTIDAD ELUIDA µg	R %
P + S	3	225	58	25
P + S	6	450	78	17
P + S	12	900	101	11
P	3	225	31	14
P	6	450	34	8
P	12	900	74	8

P: PEROXIDASAS, 1 mg

S: SUERO SANGUINEO, 0,1 ml (PROTEINAS INESPECIFICAS)

TABLA XXVIII

RENDIMIENTO DE LA ELISION CON GLICINA + 10 % DE DIOXAN

CONCENTRACION mg.Ig/ml GEL (*)	PROTEINAS ELUIDAS POR EL DIOXAN µg	PROTEINAS TOTALES ELUIDAS µg	PORCENTAJE DE PROTEINAS ELUIDAS POR EL DIOXAN
3	39	128	30
6	80	192	31
12	41	343	49

(\*) VOLUMEN DEL LECHO: 5 ml

TABLA XXIX

## VARIACION DEL VOLUMEN DE LECHO

VOLUMEN DEL LECHO ml	OFERTA	CANTIDAD TEORICA DE PROTEINAS ELUIBLES µg	CANTIDAD REAL DE PROTEINAS ELUIDAS µg	FIJACION EN % REAL/TEORICO	FIJACION EN % REAL/OFERTADO
5	P + S	225	58	25	0,725
10	P + S	450	116	26	1,45
20	P + S	900	213	24	2,66
5	P	225	31	14	3,1
10	P	450	81	18	8,1
20	P	900	161	18	16,1

P: PEROXIDASAS, 1 mg

S: SUERO SANGUINEO, 0,1 ml (PROTEINAS INESPECIFICAS)

TABLA XXX

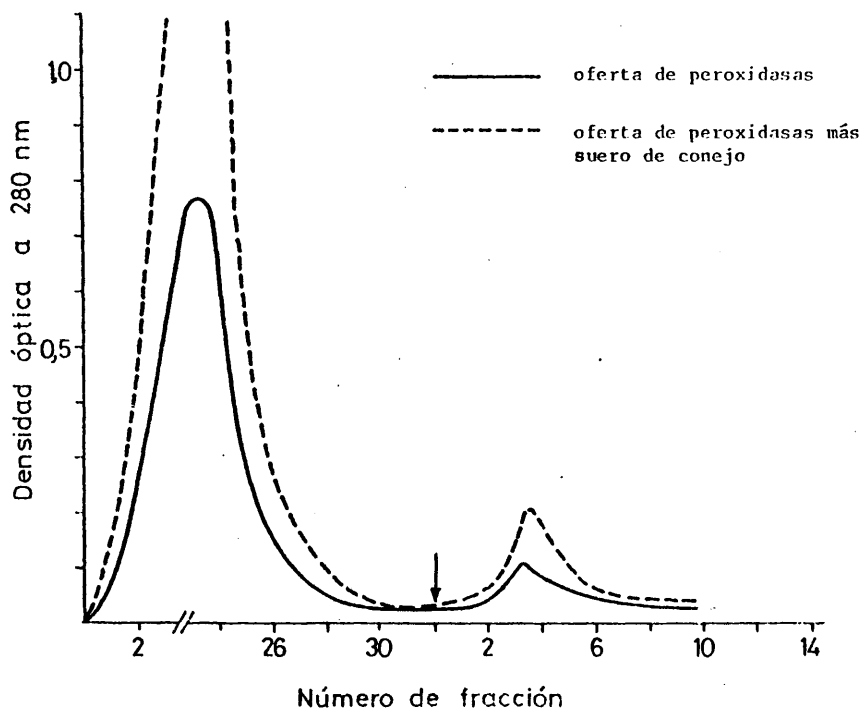
## RENDIMIENTO DE LA ELUSION CON GLICINA + 10 % DE DIOXAN

VOLUMEN DEL LECHO (*) ml	PROTEINAS TOTALES ELUIDAS µg	PROTEINAS ELUIDAS POR EL DIOXAN µg	PORCENTAJE DE PROTEINAS ELUIDAS POR EL DIOXAN
5	128	39	30
10	287	90	31
20	334	160	30

(\*) CON 3 mg Ig/ml

FIGURA 46

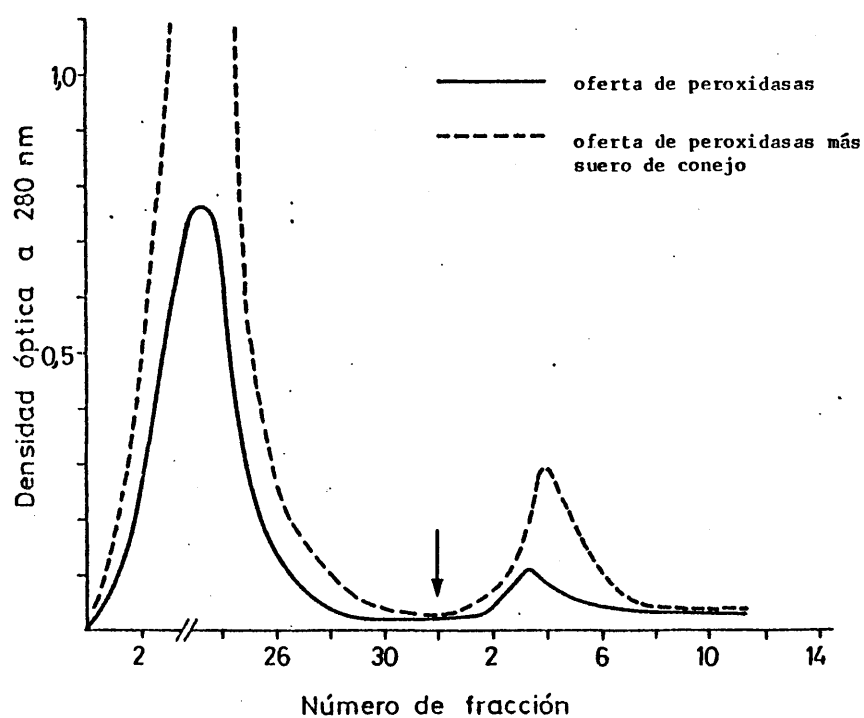
CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD  
ENTRE ANTISUERO ANTI-PEROXIDASAS Y PEROXIDASAS



Aislamiento de antígeno (peroxidasas) usando como ligando anticuerpos conjugados a Sepharosa 4B (CNBr). Se utilizó una columna de 5 ml con 3 mg de Ig/ml de gel. La flecha indica el momento en que se inicia la elución ácida.

FIGURA 47

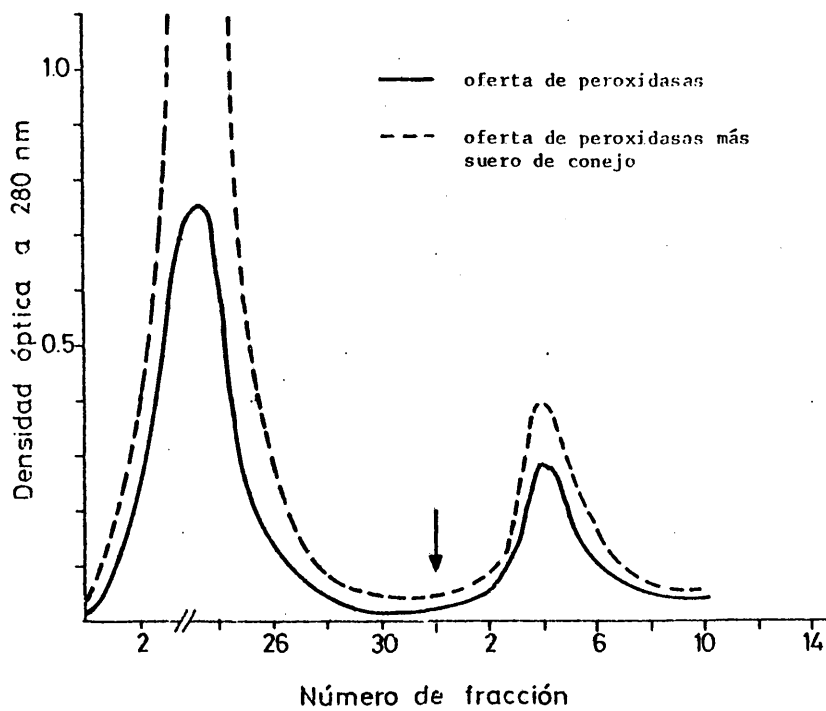
CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD  
ENTRE ANTISUERO ANTI-~~P~~EROXIDASAS Y PEROXIDASAS



Aislamiento de antígenos (peroxidasas) usando como ligando anticuerpos conjugados a Sepharosa 4B (CNBr). Se utilizó una columna de 5 ml con 6 mg de Ig/ml de gel. La flecha indica el momento en que se inicia la elución ácida.

FIGURA 48

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD  
ENTRE ANTISUERO ANTI-PEROXIDASAS Y PEROXIDASAS

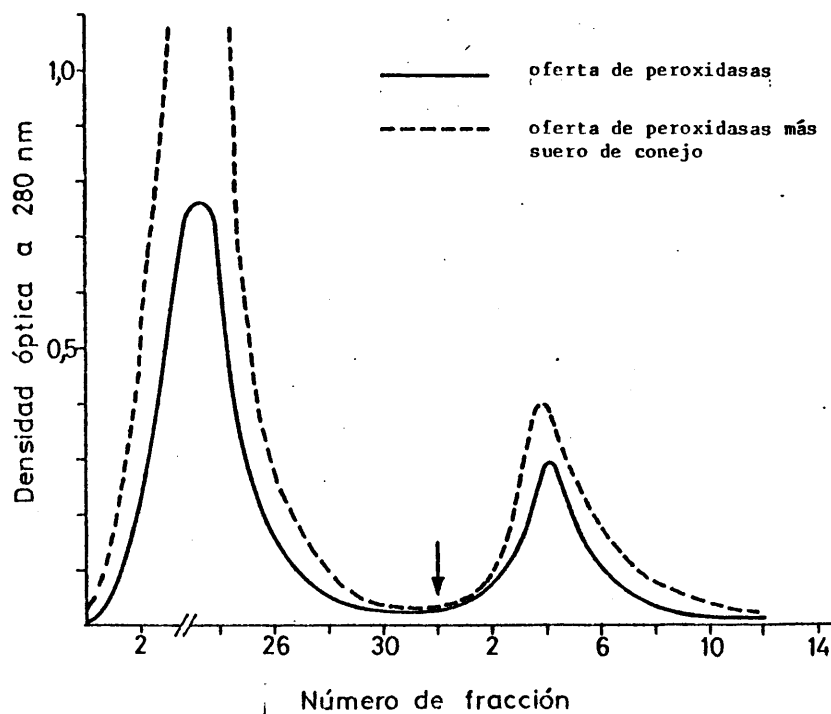


Aislamiento de antígenos (peroxidasas) usando como ligando anticuerpos conjugados a Sepharosa 4B (CNBr). Se utilizó una columna de 5 ml con 12 mg de Ig/ml de gel. La flecha indica el momento en que se inicia la elución ácida.



FIGURA 49

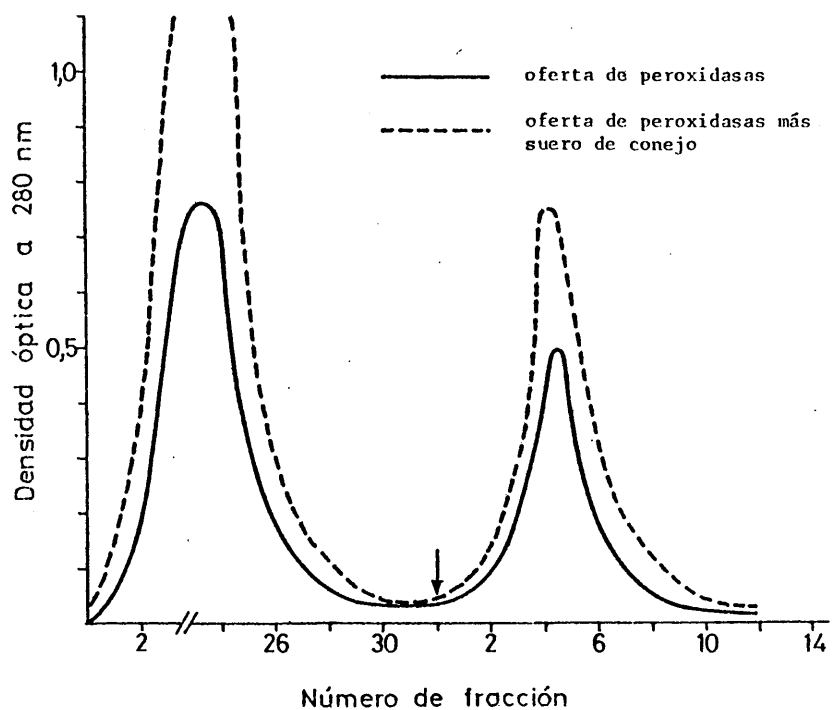
CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD  
ENTRE ANTISUERO ANTI-PEROXIDASAS Y PEROXIDASAS



Aislamiento de antígeno (peroxidasas) usando como ligando anticuerpos conjugados a Sepharosa 4B (CNBr). Se utilizó una columna de 10 ml con 3 mg de Ig/ml de gel. La flecha indica el momento en que se inicia la elución ácida.

FIGURA 50.

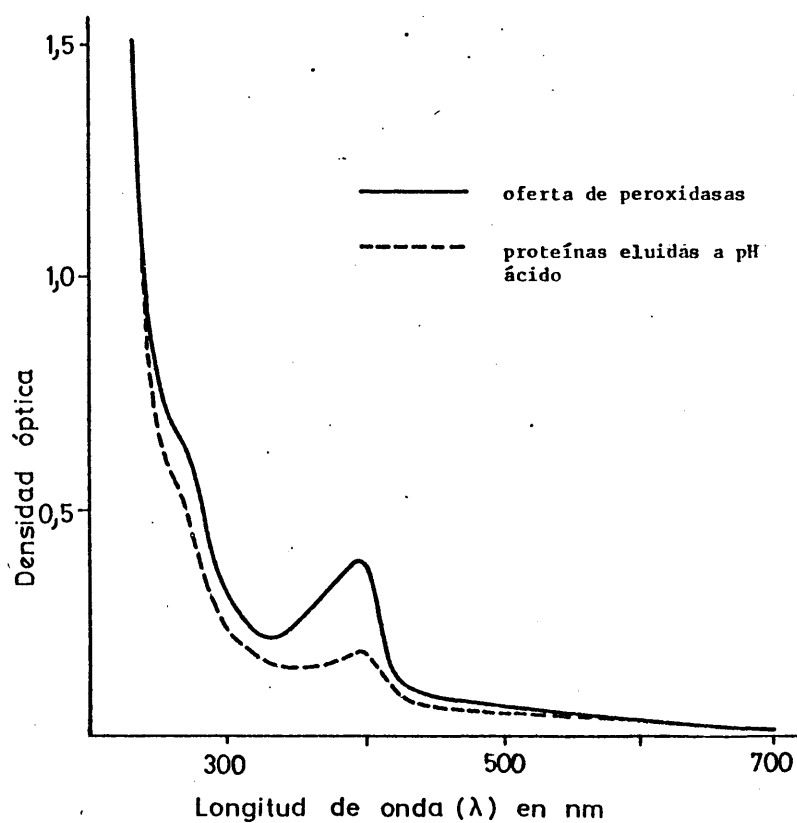
CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD  
ENTRE ANTISUERO ANTI-PEROXIDASAS Y PEROXIDASAS



Aislamiento de antígeno (peroxidasas) usando como ligando anti-cuerpos conjugados a Sepharosa 4B (CNBr). Se utilizó una columna de 20 ml con 3 mg de Ig/ml de gel. La flecha indica el momento en que se inicia la elución ácida.

FIGURA 50a.

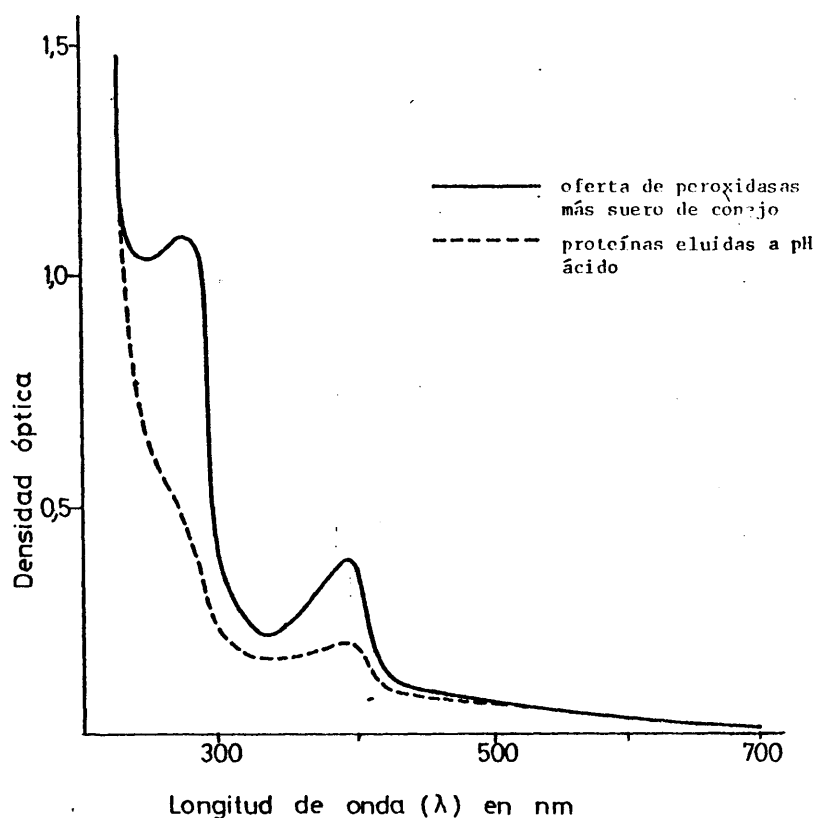
CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD DEL SISTEMA PEROXIDASA-INMUNOPEROXIDASA



Barrido espectrofotométrico control de la carga de peroxidasa pura (línea continua) y de la elución de peroxidasa con glicina a pH 2,8 (línea discontinua).

FIGURA 50b

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD DEL SISTEMA PEROXIDASA-INMUNOPEROXIDASA



Barrido espectrofotométrico de las proteínas eluidas a pH ácido en la columna de Sepharosa 4B (CNBr) conjugada con Ig anti-peroxidasa. Se ofertaron 10 ml de buffer conteniendo 1 mg de peroxidasa y 0,1 ml de suero de conejo normal con unos 8 mg de seroproteínas. El barrido muestra la especificidad de la reacción, ya que la banda de proteínas de suero no aparece en el material eluido con la glicina a pH 2,8 (línea discontinua). Esta curva de elución ácida a partir de una mezcla de proteínas es equivalente a la de la figura 50a, donde no hay más que peroxidasa pura.

C. Obtención de antígenos oncoespecíficos y oncoasociados.

C.1. Cromatografía de afinidad en microcolumnas con antígenos radiactivos.

La cantidad de antígenos oncoasociados y oncoespecíficos es variable en cada tipo de tumor y es siempre muy baja. Por esta razón hicimos la puesta a punto del método de cromatografía de afinidad utilizando antígenos procedentes de células cancerosas marcados con un producto radiactivo que permitiera el análisis de pequeñas cantidades de antígenos.

a) Pruebas previas.

Los estudios realizados para determinar las condiciones óptimas fueron los siguientes:

- a.1) Cálculo del volumen mínimo de lavado,
- a.2) retención inespecífica por la Sepharosa 4B (CNBr),
- a.3) retención inespecífica por Sepharosa 4B (CNBr) conjugada a inmunoglobulinas inespecíficas y no citotóxicas y
- a.4) aislamiento de antígenos específicos con Sepharosa 4B (CNBr) conjugada a inmunoglobulinas específicas.

El experimento se realizó en microcolumnas de 1 ml de capacidad.

Se utilizaron células CAE marcadas con hidrolizado proteico-<sup>14</sup>C como se indica más adelante. Las células se procesan de la forma indicada en el apartado de "Material y Métodos" para el aislamiento de membrana.

En estos ensayos se utilizaron tanto los antígenos de membrana solubilizada como los antígenos solubles (citosol). En todos los casos, los antígenos se ofertaron a pH 7,4, se lavaron con NaCl-Tris pH 7,4 y se eluyeron con glicina pH 2,8.

b) Cromatografía de afinidad en microcolumnas con antígenos radiactivos.

b.1) Finalidad.

Estudio analítico del aislamiento de antígenos oncoasociados y oncoespecíficos marcados con aminoácidos radiactivos.

b.2) Fundamento teórico.

La técnica consiste en la inmovilización de una molécula bio-específica o ligando, inmunoglobulinas en este experimento, por conjugación a una matriz insoluble constituida por partículas de gel de Sepharosa 4B (CNBr), seguida de la adición de la mezcla de sustancias en la que se encuentran las que queremos separar (antígenos específicos en nuestro caso). El ligando es entonces capaz de reaccionar con las sustancias con afinidad específica de la mezcla, mientras que las demás pasan sin reaccionar. Posteriormente los antígenos específicos se pueden recuperar variando las condiciones experimentales.

Las cantidades necesarias para poner a punto esta técnica mediante análisis convencionales son muy grandes. Debido a esto, hemos comenzado por utilizar antígenos marcados con  $^{14}\text{C}$ .

Las células empleadas fueron CAE en vez de CAEL, para poder realizar el marcado "in vitro" con mayor facilidad, empleando un preparado de sus membranas.

b.3) Procedimiento.

- Preparación de antígenos marcados.

1. Sembrar suficiente número de tubos con 25.000 células CAE/ml y 25 ml en cada tubo.

2. Realizar cada doce horas cambios de medio de cultivo para favorecer el crecimiento.

3. Seguir el crecimiento mediante recuentos celulares diarios.

4. Cuando el número de células en cada tubo sobrepase el  $1 \times 10^6$ , generalmente al tercer día después de la siembra, se realiza un cambio de medio con solución que contenga el producto radiactivo, que se mantiene 24 horas.

Se emplea para el marcado 0,5  $\mu\text{Ci/ml}$  de hidrolizado proteico- $\{U-^{14}\text{C}\}$ , con una actividad específica de 50  $\mu\text{Ci/ml}$  y 57 mCi/miliátomo de C.

5. A las 24 horas se procede a la recogida de las células y obtención de membranas según el procedimiento habitual (ver "Material y Métodos").

- Conjugación de inmunoglobulinas a Sepharosa 4B activada con CNBr.

1. Pesar 1 g de Sepharosa 4B (CNBr), que proporciona aproximadamente 3,5 ml de gel.

2. Transferir a un embudo de placa de vidrio de 7  $\mu\text{m}$  de diámetro.

3. Lavar durante 15 minutos con 200 ml de  $\text{HCl } 10^{-3} \text{ M}$ .

4. Lavar con  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M en  $\text{NaCl } 0,5 \text{ M}$ , pH 8 hasta que el líquido de salida tenga el mencionado pH.

5. Transferir a un tubo Corex de 15 ml con tapón de silicona.

6. Centrifugar a  $160 \times g$  durante 3 minutos.

7. Eliminar con pipeta el líquido sobrenadante, con lo que

quedan los 3,5 de gel.

8. Añadir 20 mg de inmunoglobulinas a pH 8 en buffer bicarbonatado.

9. Agitar durante dos horas a temperatura ambiente.

10. Transferir a un embudo de placa de vidrio y recoger el líquido sobrenadante; guardarlo registrando el volumen para análisis de proteínas.

11. Lavar con 15 a 20 ml de buffer bicarbonato, recoger y guardar el líquido de lavado y registrar el volumen, destinándolo al análisis de proteínas.

12. Añadir 3 volúmenes (10,5 ml) de etanolamina 1 M a pH 8.

13. Transferir a un tubo Corex de 30 ml de capacidad.

14. Agitar durante 2 horas a temperatura ambiente.

15. Transferir a un embudo y recoger el líquido sobrenadante, guardándolo para análisis de proteínas.

16. Lavar con 4 volúmenes (14 ml) de buffer boratado a pH 8, guardando el líquido de lavado para análisis de proteínas.

17. Lavar con 4 volúmenes de buffer acetato a pH 4 y guardar el líquido de lavado para análisis de proteínas.

18. Repetir estos lavados otras dos veces, guardando siempre los líquidos de lavado para análisis de proteínas.

19. Guardar el gel en NaCl 0,14 M Tris 20 mM con azida sódica al 0,1 % a 4°C hasta su utilización en las microcolumnas.

- Preparación de las microcolumnas.

1. Preparar tubos de 2 ml de capacidad, de 7 mm de diámetro



interior en la embocadura y terminados en forma cónica. Se cierra la salida empacando la porción terminal con una pequeña cantidad de fibra de vidrio.

2. Disponer el número necesario de microcolumnas, seleccionando aquellas que tengan igual velocidad de flujo, alrededor de 5 ml por hora.

3. Añadir 50 µl de Sepharosa 4B (CNBr) inactivada con etanolamina para que rellene los huecos de la fibra de vidrio y no deje pasar a la Sepharosa 4B (CNBr) activada.

4. Añadir 750 µl de Sepharosa 4B (CNBr) conjugada con las inmunoglobulinas correspondientes según el experimento.

5. Añadir 250 µl de Sepharosa 4B (CNBr) inactivada para evitar que se mueva la parte superior de la columna al añadir líquidos.

6. Lavar bien con buffer NaCl pH 7,4 para eliminar el azida sódica.

- Adición de antígenos y obtención de antígenos específicos.

1. Ofertar a las microcolumnas 5,0 mg de antígenos marcados con aminoácidos  $^{14}\text{C}$  a una concentración de 0,5 mg/ml.

2. Recoger en fracciones de 1 ml.

3. Lavar con 15 ml de buffer NaCl 0,14 M Tris 20 mM pH 7,4.

4. Recoger en fracciones de 1 ml.

5. Elidir con 6 ml de buffer glicina pH 2,8.

6. Recoger en fracciones de 0,5 ml.

7. Guardar todas las fracciones para análisis de radiactividad.

dad.

## b.4) Experimentos realizados.

## - Cálculo del volumen mínimo de lavado.

Este experimento tiene por objeto conocer la mínima cantidad de buffer de lavado necesaria para que el pico de proteínas inespecíficas no se solape con la elusión de proteínas específicas.

Se llevó a cabo con 4 microcolumnas de 1 ml cada una, cargadas con Sepharosa inactivada.

Las columnas se hicieron por duplicado, lavando dos de ellas con 15 ml y las otras dos con 5 ml (tablas XXXI y XXXII).

Los resultados obtenidos (figura 51) indicaron que 5 ml resultan insuficientes, requiriéndose unos 10 ml. Para trabajar con un margen de seguridad utilizamos 15 ml.

TABLA XXXI

RELACION ENTRE VOLUMEN DE LAVADO Y CANTIDAD DE ANTIGENOS ELUIDOS

MICROCOLUMNAS	VOLUMEN DE LAVADO ml	ANTIGENOS- <sup>14</sup> C ELUIDOS A pH 2,8	
			µg
A - 1	15		8,7
A - 2	15		8,5
A - 3	5		12,5
A - 4	5		12,2

## - Retención inespecífica por Sepharosa 4B (CNBr)

Este experimento tiene por objeto calcular el fondo que aparece debido a una retención inespecífica de proteínas por parte de la Sepha-

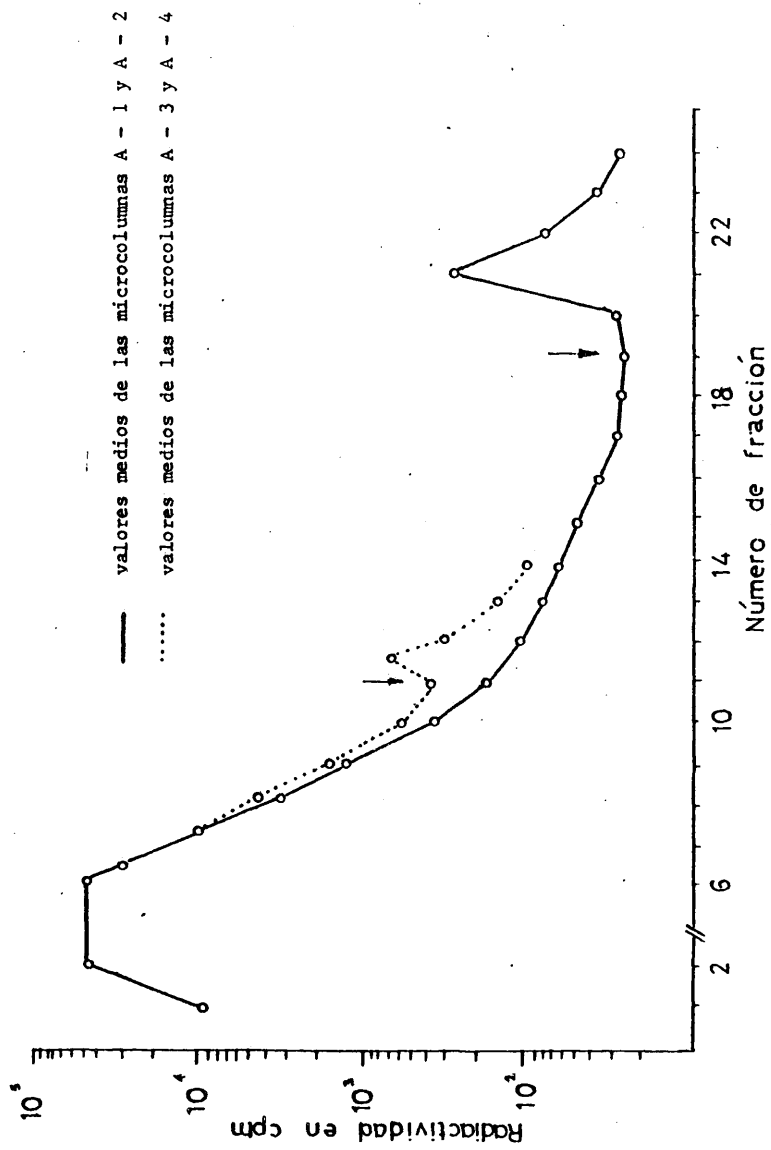
TABLA XXXII

RECuento DE RADIATIVIDAD DE LOS ANTIGENOS-<sup>14</sup>C ELUIDOS

VOLUMEN ml	cpm EN LAS DISTINTAS COLUMNAS			
	A - 1	A - 2	A - 3	A - 4
SALIDA DE MATERIAL TRAS LA OFERTA DE ANTIGENO				
1	12500	6000	6050	8500
2	42500	43500	38500	45000
3	45800	46000	43800	50000
4	47000	50000	46850	49800
5	50000	52500	49580	5200
SALIDA DE MATERIAL TRAS EL LAVADO				
6	51500	53000	51000	50900
7	30000	10500	28300	17300
8	10500	2000	7600	5400
9	3200	650	1980	1300
10	1000	450	950	430
SALIDA TRAS TRATAMIENTO CON GLICINA				
11	330	235	355	460
11,5			625	650
12	160	150	400	320
12,5			360	220
13	110	120	180	190
14	85	96	120	106
15	83	80		
16	61	90		
17	65	66		
18	55	50		
19	50	70		
20	37	70		
SALIDA TRAS TRATAMIENTO CON GLICINA				
21	310	140		
21,5	500	310		
22	280	225		
22,5	170	165		
23	130	120		
24	40	60		

FIGURA 51

CALCULO DEL VOLUMEN DE LAVADO NECESARIO PARA ELIMINAR LAS PROTEINAS INESPECIFICAS



rosa.

El experimento se realizó con 4 columnas de 1 ml cada uno que recibieron como oferta los antígenos marcados. La cantidad de antígenos eluidos fue de 7,5 µg en promedio.

Los resultados nos dan una idea del fondo, que hay que descontar de los valores de retención específica en los otros experimentos.

- Retención inespecífica por Sepharosa 4B(CNBr) conjugada a inmunoglobulinas no específicas ni citotóxicas.

Este experimento se hizo para confirmar que la diferencia que existe entre los blancos y las columnas con Sepharosa conjugada a inmunoglobulinas específicas no era debida a una retención inespecífica de las inmunoglobulinas por razones estéricas, sino a una verdadera reacción específica antígeno-anticuerpo.

Para realizarlo se utilizaron 4 columnas, 2 blancos con Sepharosa inactivada y dos con Sepharosa conjugada a inmunoglobulinas humanas, totalmente inespecíficas para los antígenos usados y se ofertaron, como en los casos anteriores, 5 mg de antígenos marcados con aminoácidos-<sup>14</sup>C (tablas XXXIII y XXXIV) y figura 52.

TABLA XXXIII

RETENCION INESPECIFICA DE PROTEINAS POR INMUNOGLOBULINAS INESPECIFICAS

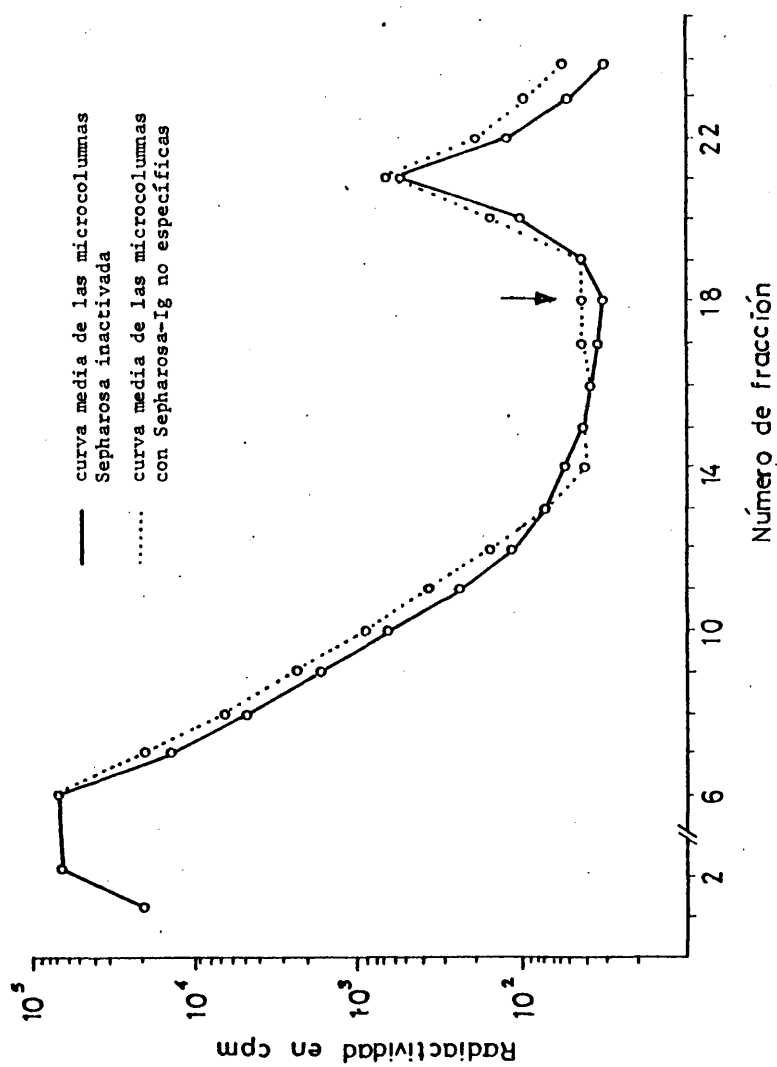
MICROCOLUMNAS	SEPHAROSA	ANTIGENOS ELUIDOS pH 2,8 µg
A - 1	Inactivada	6,3
A - 2	Inactivada	7,5
A - 3	Conjugada a Ig	6,7
A - 4	Conjugada a Ig	9,5

TABLA XXXIV

RECuento DE LA RADIACTIVIDAD DE LAS PROTEINAS ELUIDAS  
EN EL EXPERIMENTO DE RETENCION INESPECIFICA

VOLUMEN ml	cpm EN LAS DISTINTAS COLUMNAS			
	A - 1	A - 2	A - 3	A - 4
SALIDA DE MATERIAL TRAS LA OFERTA DE ANTIGENO				
1	14000	20700	29000	6000
2	46000	45000	45900	44300
3	47500	46500	43000	47000
4	45000	48700	47000	45200
5	47200	45000	48500	48300
SALIDA DE MATERIAL TRAS EL LAVADO				
6	46000	42000	43100	43200
7	12000	18500	31500	28900
8	3000	7000	9200	8200
9	1000	800	2300	800
10	500	450	500	400
11	200	160	200	300
12	140	120	100	200
13	100	100	80	100
14	80	90	90	95
15	60	70	70	80
16	50	60	60	75
17	50	40	50	90
18	50	60	40	50
19	40	50	60	40
20	40	40	50	60
SALIDA DE MATERIAL TRAS TRATAMIENTO CON GLICINA				
21	275	660	400	150
21,5	380	190	350	750
22	150	95	120	400
22,5	60	60	50	120
23	50	30	40	80
24	40	20	40	60

FIGURA 52  
RELACION INESPECIFICA DE PROTEINAS POR INMUNOGLOBULINAS INESPECIFICAS



- Aislamiento de antígenos específicos con Sepharosa conjugada a inmunoglobulinas específicas.

Este experimento se realizó con 4 columnas, dos cargadas con Sepharosa conjugada a inmunoglobulinas específicas y otras dos con Sepharosa inactivada, como blanco de retención inespecífica.

Se encontró una gran diferencia en la cantidad de material retenido, debida evidentemente a la reacción específica (tablas XXXV y XXXVI y figura 53).

TABLA XXXV

RETENCION ESPECIFICA DE ANTIGENOS POR INMUNOGLOBULINAS ESPECIFICAS

MICROCOLUMNAS	SEPHAROSA	ANTIGENOS ELUIDOS pH 2,8 µg
A - 1	Inactivada	6,25
A - 2	Inactivada	7,5
A - 3	Conjugada Ig	16
A - 4	Conjugada Ig	15,75

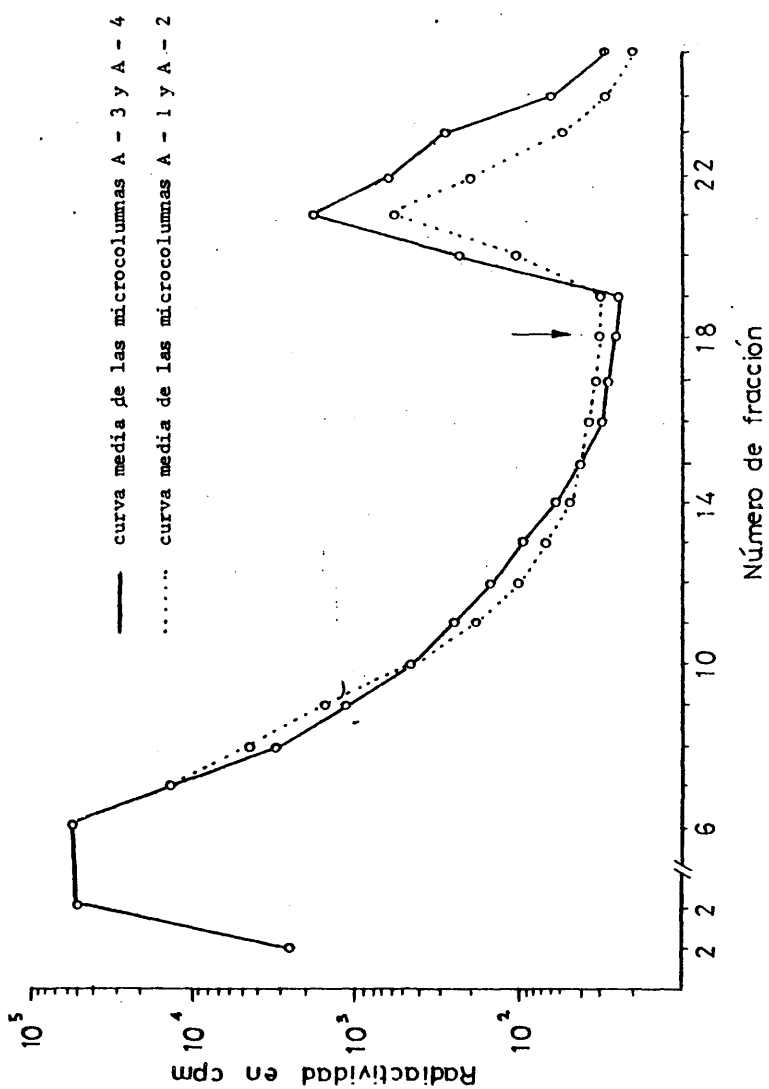


TABLA XXXVI

RECuento DE LA RADIACTIVIDAD DE LAS PROTEINAS ELUIDAS  
EN EL AISLAMIENTO DE ANTIGENOS ESPECIFICOS

VOLUMEN ml	cpm EN LAS DISTINTAS COLUMNAS			
	A - 1	A - 2	A - 3	A - 4
SALIDA DE MATERIAL TRAS LA OFERTA DE ANTIGENO				
1	14000	20700	16200	16300
2	46000	45000	43500	44000
3	47500	46500	41700	41500
4	45000	48700	46000	46800
5	47200	45000	45000	42500
SALIDA DE MATERIAL TRAS EL LAVADO				
6	46000	42000	45500	43000
7	12000	18500	19900	24000
8	3000	7000	1600	2500
9	1000	800	800	900
10	500	450	500	500
11	200	160	300	220
12	140	120	200	150
13	100	100	150	140
14	80	90	130	120
15	60	70	100	120
16	50	60	90	110
17	50	40	80	100
18	50	60	70	80
19	40	50	60	90
20	40	40	70	80
SALIDA DE MATERIAL TRAS TRATAMIENTO CON GLICINA				
21	275	660	150	145
21,5	380	190	840	1250
22	150	95	740	560
22,5	60	60	240	150
23	50	30	170	120
24	40	20	100	80
25	50	40	60	30

FIGURA 53  
AISLAMIENTO DE ANTIGENOS ESPECÍFICOS SOBRE INMUNOGLOBULINAS ESPECÍFICAS FIJADAS A SEPHAROSA 4B (CNBr)



### C.2. Sistema membranas de CAEL/anticuerpos anti-antígenos normales.

A una columna de Sepharosa 4B (CNBr) de 5 ml se ofertaron 28 mg de inmunoglobulinas anti-membrana normal de ratón, de las que se conjugaron 27 mg, que representan un rendimiento de conjugación del 96 %.

Se ofertaron después 7 mg de membranas solubilizadas de células CAEL, consiguiendo eluir 1,2 mg tras el tratamiento a pH ácido equivalente a una proporción de 17 % (figura 54).

Las proteínas eluidas se concentraron y lavaron en una membrana Centriflo CF 25 para eliminar la glicina y se probó su actividad biológica por inhibición de la citotoxicidad sobre células CAEL.

Se absorbió el antisuero anti-membranas normales con las proteínas eluidas, así como con las proteínas ofertadas a la columna, para que sirvieran de control. Se vio que había una concentración en la actividad biológica en las proteínas eluidas. En las tablas XXXVII y XXXVIII quedan reflejados estos valores.

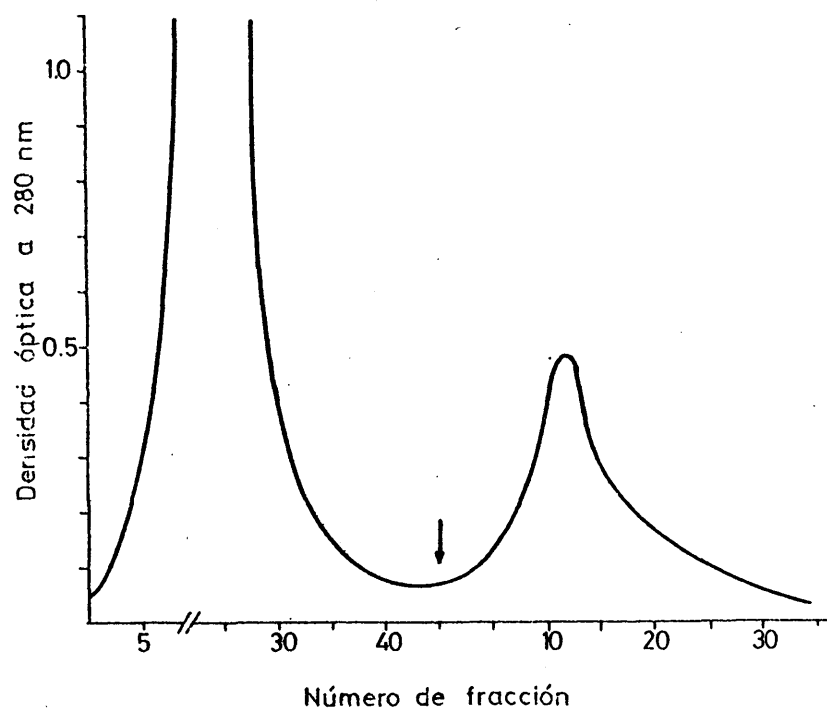
TABLA XXXVII

#### INHIBICION DE LA CITOTOXICIDAD DEL INMUNOSUERO ANTI-ANTIGENOS NORMALES ABSORBIDOS CON MEMBRANAS SOLUBILIZADAS DE CAEL

MEMBRANAS SOLUBILIZADAS CAEL AÑADIDAS	MORTALIDAD QUE PROVOCA EL INMUNOSUERO ANTI-NORMAL
µg	%
0	100
20	75
100	50
200	10
200	15

FIGURA 54

ASLAMIENTO DE ANTIGENOS  
POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD



Elución de antígenos de membrana plasmática solubilizada de células CAEL en Sepharosa 4B (CNBr) conjugada a inmunoglobulinas anti-membrana plasmática de células normales de ratón. Se ofertaron 7 mg de membranas de CAEL y se recogieron 1,2 mg de antígenos.

TABLA XXXVIII

INHIBICION DE LA CITOTOXICIDAD DEL INMUNOSUERO ANTI-ANTIGENOS NORMALES  
ABSORBIDOS CON PROTEINAS ELUIDAS

PROTEINAS ELUIDAS CAEL ANADIDAS	MORTALIDAD POR INMUNOSUERO ANTI-ANTIGENOS NORMALES
$\mu$ g	%
0	100
1,6	100
8	59
16	30
16	13

C.3. Sistema membranas de CAEL/anticuerpos anti-antígenos cancerosos.

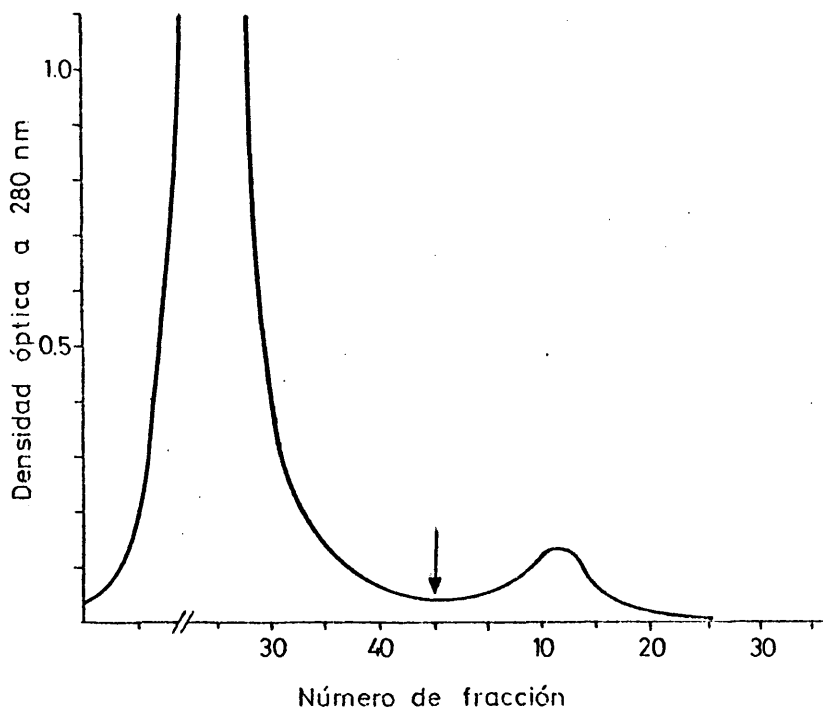
En una columna de Sepharosa 4B( CNBr) se cargaron 10 mg de inmunoglobulinas anti-membrana de CAEL obtenidas de un conejo quimera inmunológica. Se conjugaron 18 mg, correspondientes a un rendimiento del 95 %.

Se ofertaron 5 mg de membranas de CAEL solubilizadas, de los que se elidieron a pH ácido 80  $\mu$ g, que representar una proporción de 1,6% (Fig.55).

Las proteínas eluidas se concentraron y lavaron en una membrana Centriflo CF 25 para eliminar el buffer glicina y se utilizaron para probar su actividad biológica por inhibición de la citotoxicidad sobre células CAEL, así como por inmunogenicidad.

La inhibición de la citotoxicidad se realizó absorbiendo el suero anti-membrana de CAEL de conejos quimera inmunológica con antígenos de membrana de CAEL utilizados para la oferta de las columnas, así como con los antígenos eluidos de la columna a pH ácido, obteniéndose los resultados expresados en las tablas XXXIX y XL.

FIGURA 55  
AISLAMIENTO DE ANTIGENOS  
POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD



Elusión de membrana plasmática purificada de células CAEL en Sepharosa 4B (CNBr) conjugada a inmunoglobulina anti-membrana plasmática de células CAEL. Las inmunoglobulinas se obtuvieron por inmunización selectiva de conejos quimera inmunológicos. Se ofertaron 5 ng de membranas de CAEL y se recogieron 80 µg de antígenos.

TABLA XXXIX

INHIBICION DE LA CITOTOXICIDAD DEL INMUNOSUERO ANTI-ANTIGENOS DE CAEL  
ABSORBIDOS CON MEMBRANAS SOLUBILIZADAS DE CAEL

MEMBRANAS SOLUBILIZADAS DE CAEL AÑADIDAS	MORTALIDAD QUE PROVOCA EL INMUNOSUERO ANTI-ANTIGENOS DE CAEL EN
µg	%
0	100
20	80
100	57
200	15
200	15

TABLA XL

INHIBICION DE LA CITOTOXICIDAD DEL INMUNOSUERO ANTI-ANTIGENOS DE CAEL  
ABSORBIDO CON PROTEINAS ELUIDAS

PROTEINAS ELUIDAS AÑADIDAS	MORTALIDAD QUE PROVOCA EL INMUNOSUERO ANTI-ANTIGENOS DE CAEL EN
µg	%
0	100
0,7	90
3,5	48
7,0	25
7,0	15

Tanto en este caso como en el anterior hubo que eliminar el fluoruro de metil-fenil-sulfonyl y el tritón X-100 en los que se encontraban las proteínas con las que había que absorber los inmunosueros, ya que producen ci-

totoxicidad.

Las pruebas realizadas indicaron que la máxima concentración en que se pueden añadir para que no produzcan citotoxicidad es de 0,0016 % para el tritón X-100 y 3  $\mu$ M para el fluoruro de metil-fenil-sulfonil.

#### VI. PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD

Esta técnica la llevamos a cabo inyectando grupos de ratones con sustancias antigénicas celulares y evaluando posteriormente la aparición de tumor, su regresión o la no aparición de tumor.

Como sustancias antigénicas utilizamos distintas fracciones que se van obteniendo en los pasos sucesivos del aislamiento de membranas. Estas fracciones comprenden:

- crudo antigénico A: proteínas solubles (citosol), membrana plasmática, retículo endoplásmico, mitocondrias y microsomas,
- crudo antigénico B: membrana plasmática, fracción microsómica, retículo endoplásmico y mitocondrias,
- membranas purificadas: se obtienen al final del proceso de aislamiento de membranas,
- membranas solubilizadas: son las membranas purificadas después de la solubilización por ultrasonidos,
- proteínas solubles: antígenos del citosol y
- membranas seleccionadas: fracciones de membranas solubilizadas obtenidas por cromatografía de afinidad.

Se hicieron 21 grupos de ratones a los que se inmunizó con las sustan-



cias antigénicas mencionadas anteriormente en las distintas dosis indicadas en la tabla XLI y se incluyeron además grupos de ratones control.

Los controles que se realizaron fueron:

- animales a los que no se les dio ningún tratamiento,
- animales solamente inoculados con células cancerosas,
- controles de inmunización, en los que se inmunizaron los ratones con tejido normal.

La evolución individual de los ratones de cada uno de los grupos se ha representado en las figuras 56 a 76. Dichos grupos son los mismos a los que se hace referencia en las tablas XLI y XLII.

La tabla XLII reúne los resultados finales proporcionados por los 21 grupos de animales estudiados.

El período de observación considerado en las pruebas de inmunogenicidad fue de 70 días, al cabo del cual, de los 126 ratones utilizados para este experimento, quedaban vivos solamente 3 con tumor (figuras 58, 60 y 67), que murieron poco tiempo después.

TABLA XLI

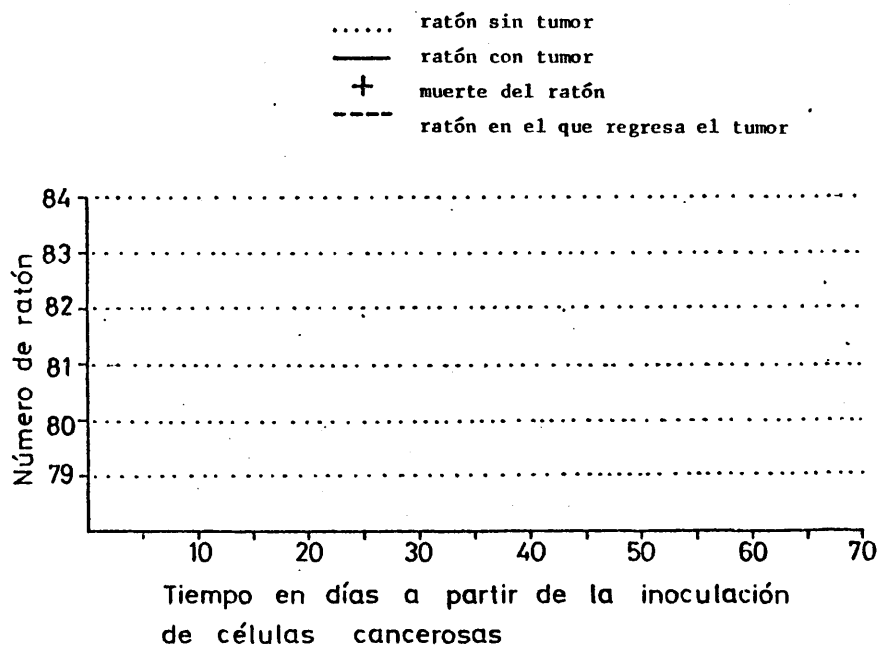
## PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD DE LOS ANTIGENOS CANCEROSOS

TRATAMIENTO	GRUPO N°	REPARTO DE LA DOSIS			CANTIDAD TOTAL DE ANTIGENOS µg	INOCULACION DE CELULAS CAEL DIA 30 N° DE CELULAS
		1ª DOSIS	2ª DOSIS	3ª DOSIS		
		DIA 0 µg	DIA 8 µg	DIA 16 µg		
NINGUNO	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	25.000
CRUDO ANTI- GENICO A (CELULAS NORMALES)	3	200	900	900	2000	25.000
	4	100	450	450	1000	25.000
	5	50	225	225	500	25.000
CRUDO ANTI- GENICO A (CELULAS CAEL)	6	200	2000	2000	4200	25.000
	7	100	1000	1000	2100	25.000
	8	200	900	900	2000	25.000
	9	100	450	450	1000	25.000
	10	50	225	225	500	25.000
	11	40	180	180	400	25.000
MEMBRANAS PURIFICA- DAS	12	20	90	90	200	25.000
	13	10	45	45	100	25.000
	14	2	20	20	42	25.000
MEMBRANAS SOLUBILI- ZADAS	15	20	90	90	200	25.000
	16	10	45	45	100	25.000
	17	2	20	20	42	25.000
MEMBRANAS SELECCIONA- DAS	18	1,3	6	6	13,3	25.000
CRUDO ANTI- GENICO B (CELULAS CAEL)	19	40	400	400	840	25.000
	20	20	200	200	420	25.000
PROTEINAS SOLUBLES	21	80	800	800	1680	25.000

FIGURA 56

## PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD

## GRUPO 1: CONTROL DE SUPERVIVENCIA

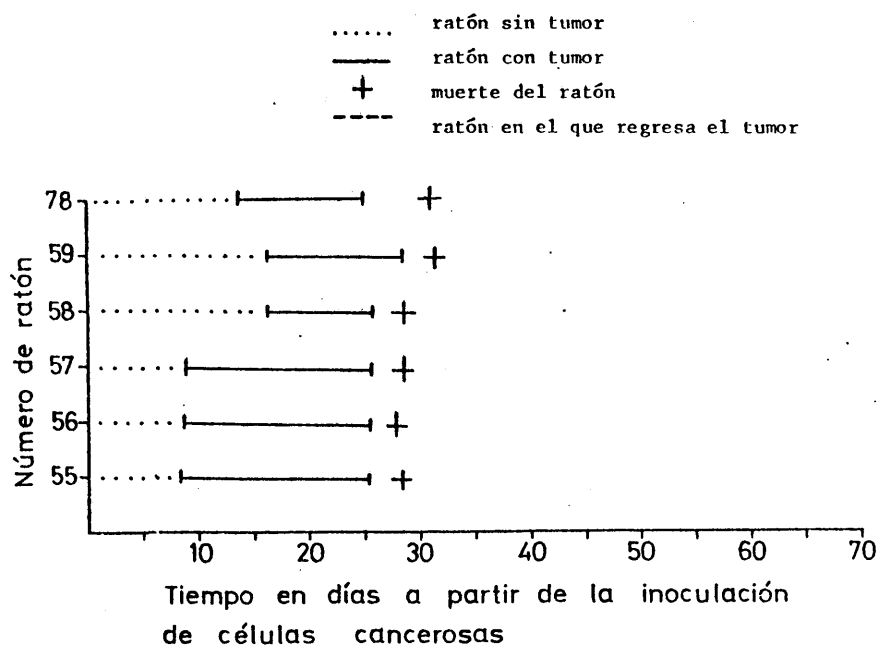


A este grupo de ratones no se le dio ningún tipo de tratamiento. Los animales vivieron normalmente y en ninguno aparecieron tumores.

FIGURA 57

## PRUEBAS DE INMUNOGÉNICIDAD

## GRUPO 2: CONTROL DE INOCULACION CON CELULAS CANCEROSAS

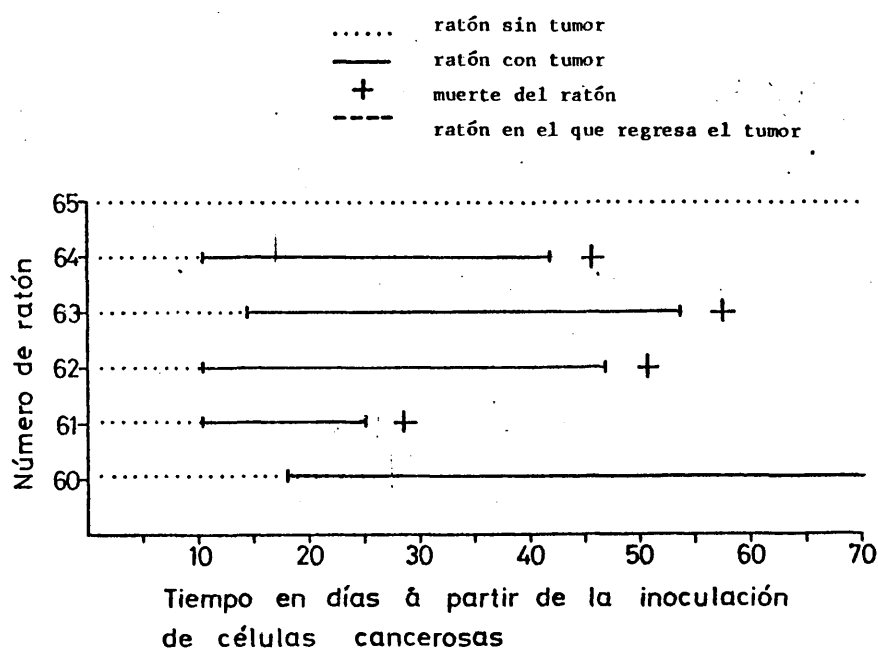


A este grupo de ratones se les inyectó con 25.000 células CAEL sin inmunización previa. Todos los animales desarrollaron tumores y murieron a consecuencia del mismo en el término de 25 a 28 días después de la inoculación.

FIGURA 58

## PRUEBAS DE INMUNÓGENICIDAD

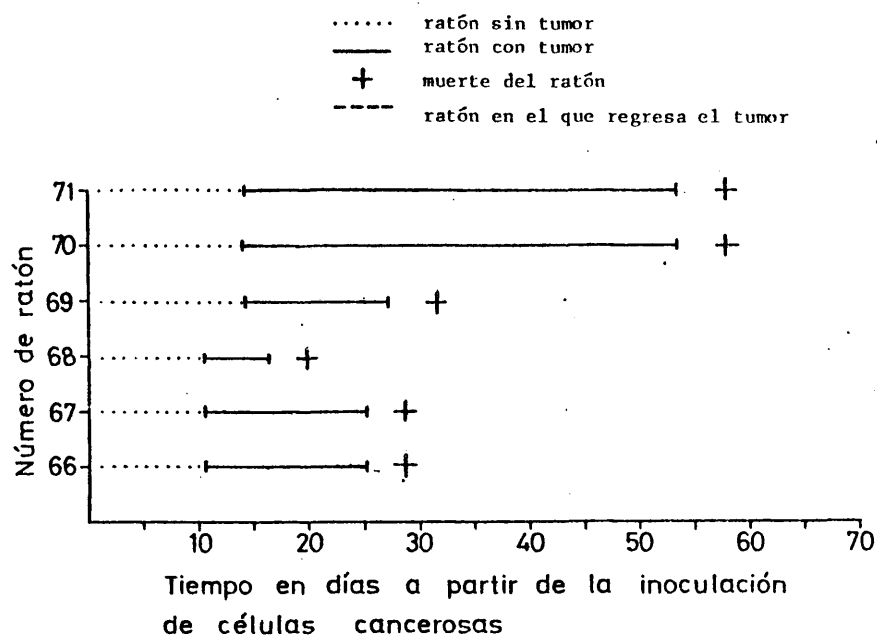
## GRUPO 3: CONTROL DE INMUNIZACION CON ANTIGENOS NORMALES



A este grupo de ratones se les inmunizó con 2000  $\mu$ g de crudo antigénico A de células de ratón normal y después se inocularon con 25.000 células CAEL. Todos los animales, excepto uno, desarrollaron tumores y murieron a consecuencia de ellos, indicando que los antígenos normales no inmunizan contra la proliferación cancerosa.

FIGURA 59

PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD  
GRUPO 4: CONTROL DE INMUNIZACION CON ANTIGENOS NORMALES

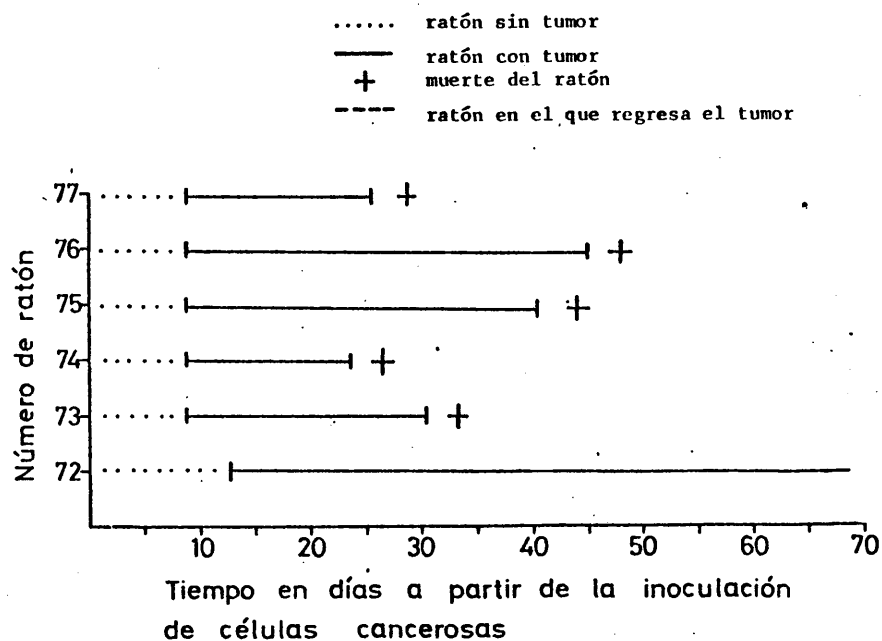


A este grupo de animales se les inmunizó con 1000  $\mu$ g de crudo antigénico A, procedente de células normales de ratón y después se inocularon con 25.000 células CAEL. Todos los animales murieron con tumor.

FIGURA 60

## PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD

## GRUPO 5: CONTROL DE INMUNIZACION CON ANTIGENOS NORMALES



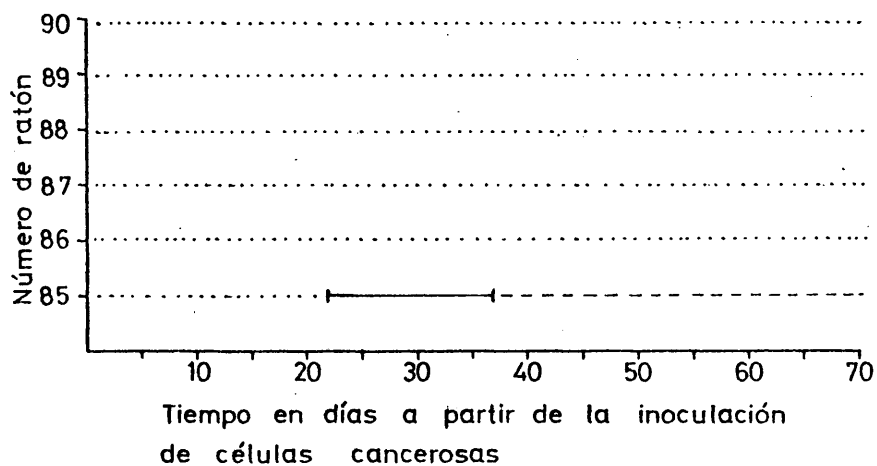
A este grupo de animales se les inmunizó con 500  $\mu$ g de crudo antigénico  
 A de células normales de ratón después se les inocularon 25.000 células CAEL.  
 Todos los animales desarrollaron y murieron con tumor.

FIGURA 61

## PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD

GRUPO 6: INMUNIZACION CON CRUDO ANTIGENICO A

..... ratón sin tumor  
—— ratón con tumor  
+ muerte del ratón  
----- ratón en el que regresa el tumor



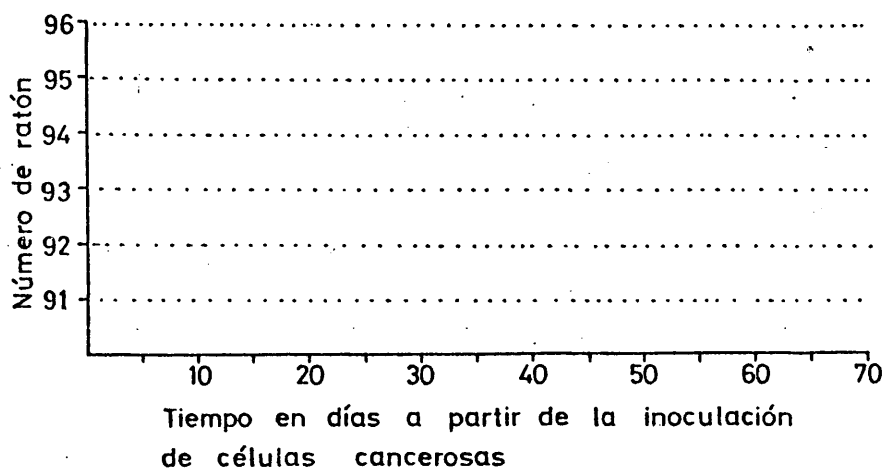
A los animales de este grupo se les inmunizó con 4.200  $\mu$ g de crudo antigénico A de células CAEL y después se les inocularon 25.000 células CAEL. En cinco animales las células cancerosas no proliferaron y en uno apareció un tumor que regresó definitivamente a los 37 días.



FIGURA 62

PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD  
GRUPO 7: INMUNIZACION CON CRUDO ANTIGENICO A

..... ratón sin tumor  
—— ratón con tumor  
+ muerte del ratón  
---- ratón en el que regresa el tumor

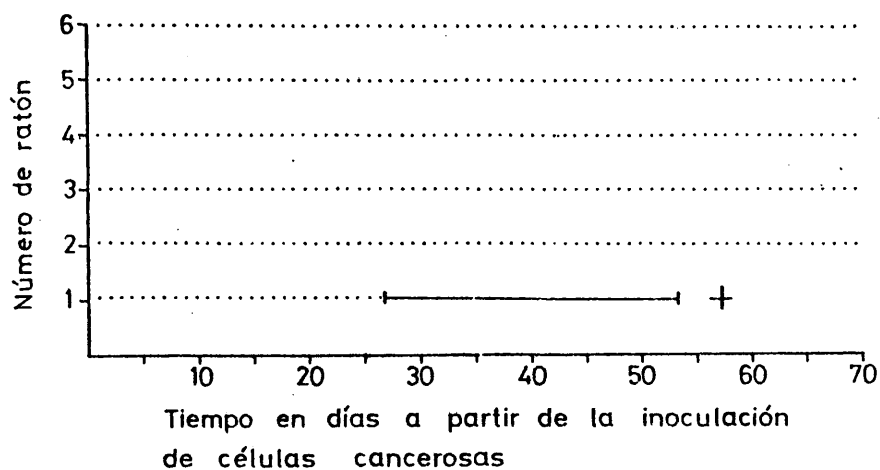


A este grupo de animales se les inmunizó con 2.100  $\mu$ g de crudo antigénico A de células CAEL y después fueron inoculados con 25.000 células CAEL. Ninguno de los animales desarrolló tumor.

FIGURA 63

PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD  
GRUPO 8: INMUNIZACION CON CRUDO ANTIGENICO A

..... ratón sin tumor  
—— ratón con tumor  
+ muerte del ratón  
---- ratón en el que regresa el tumor

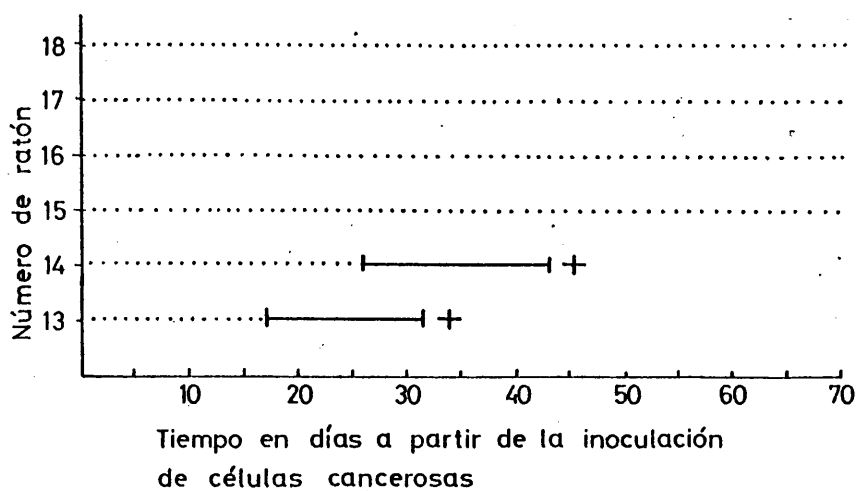


Estos animales fueron inmunizados con 2.000  $\mu$ g de crudo antigénico A e inoculados a continuación con 25.000 células CAEL. Cinco animales no desarrollaron tumor y uno de ellos lo hizo, muriendo a los 53 días.

FIGURA 64

PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD  
GRUPO 9: INMUNIZACION CON CRUDO ANTIGENICO A

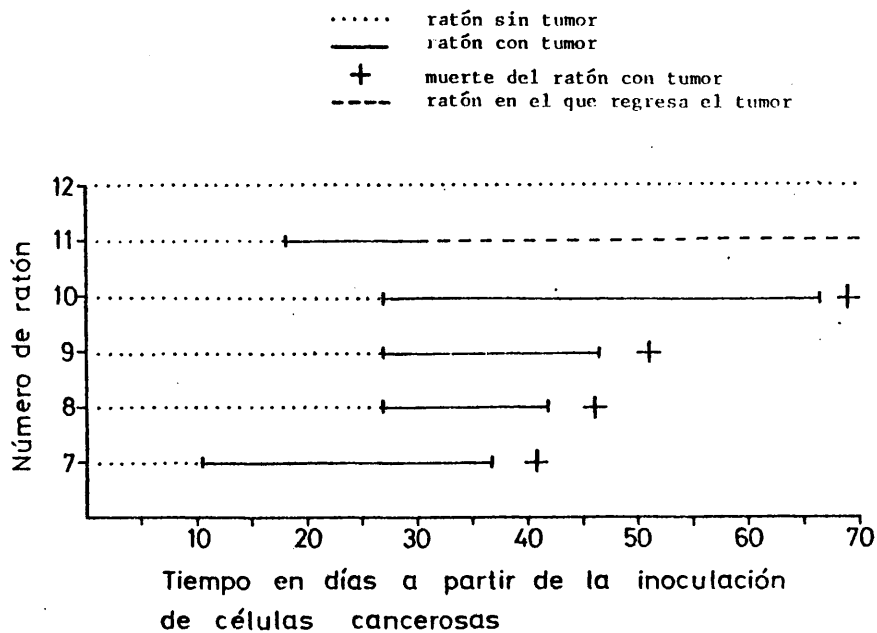
..... ratón sin tumor  
—— ratón con tumor  
+ muerte del ratón



Los animales fueron inmunizados con 1.000  $\mu$ g de crudo antigénico A de células CAEL, y después se inocularon con 25.000 células CAEL. Cuatro animales no desarrollaron tumor y dos sí; muriendo a los 32 y 43 días.

FIGURA 65

PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD  
GRUPO 10: INMUNIZACION CON CRUDO ANTIGENICO A

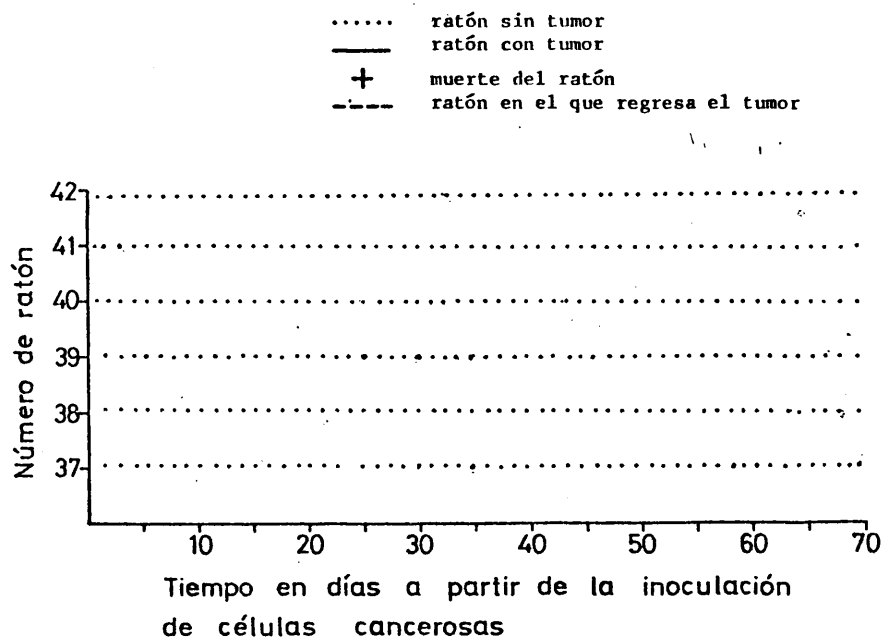


Este grupo de animales fue inmunizado con 500  $\mu$ g de crudo antigénico A de células CAEL y consecutivamente inoculado con 25.000 células CAEL. En cuatro animales proliferaron las células cancerosas, muriendo entre los 36 y 66 días; un animal desarrolló un tumor que regresó definitivamente a los 30 días y un animal permaneció libre de tumor.

FIGURA 66

## PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD

GRUPO 11: INMUNIZACION CON MEMBRANA PLASMATICA PURIFICADA



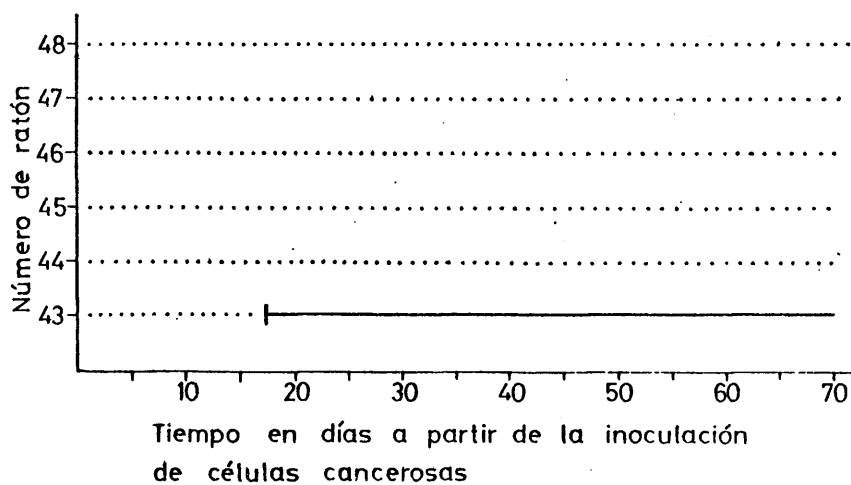
A este grupo de animales se le inmunizó con 400  $\mu$ g de membrana plasmática purificada de células CAEL y después se le inoculó 25.000 células CAEL. Ninguno de los animales desarrolló tumor.

FIGURA 67

## PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD

## GRUPO 12: INMUNIZACION CON MEMBRANA PLASMATICA PURIFICADA

..... ratón sin tumor  
—— ratón con tumor  
+ muerte del ratón

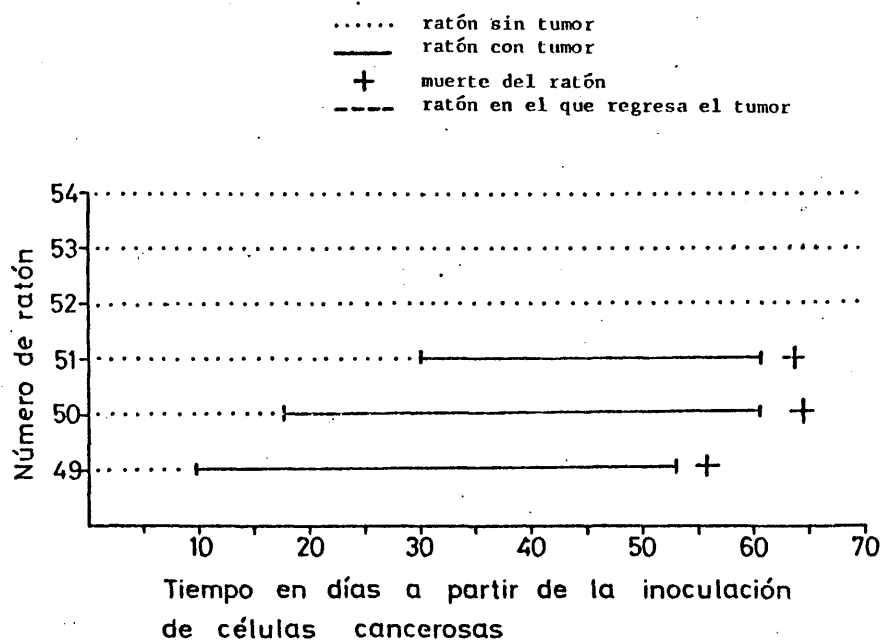


Los animales de este grupo fueron inmunizados con 200  $\mu$ g de membrana plasmática purificada de células CAEL y después inoculados con 25.000 células CAEL. En cinco animales no evolucionaron las cancerosas y en uno sí.

FIGURA 68

## PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD

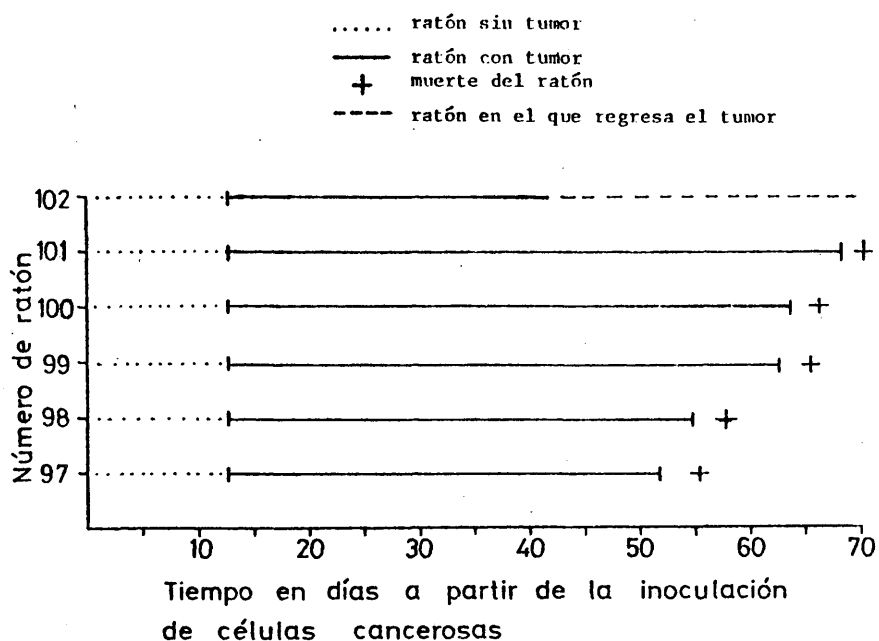
GRUPO 13: INMUNIZACION CON MEMBRANA PLASMATICA PURIFICADA



A este grupo de animales se le inmunizó con 100  $\mu$ g de membrana plasmática purificada de células CAEL y luego se le inoculó 25.000 células CAEL. Tres animales desarrollaron tumor y tres no.

FIGURA 69

PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD  
GRUPO 14: INMUNIZACION CON MEMBRANA PLASMATICA PURIFICADA



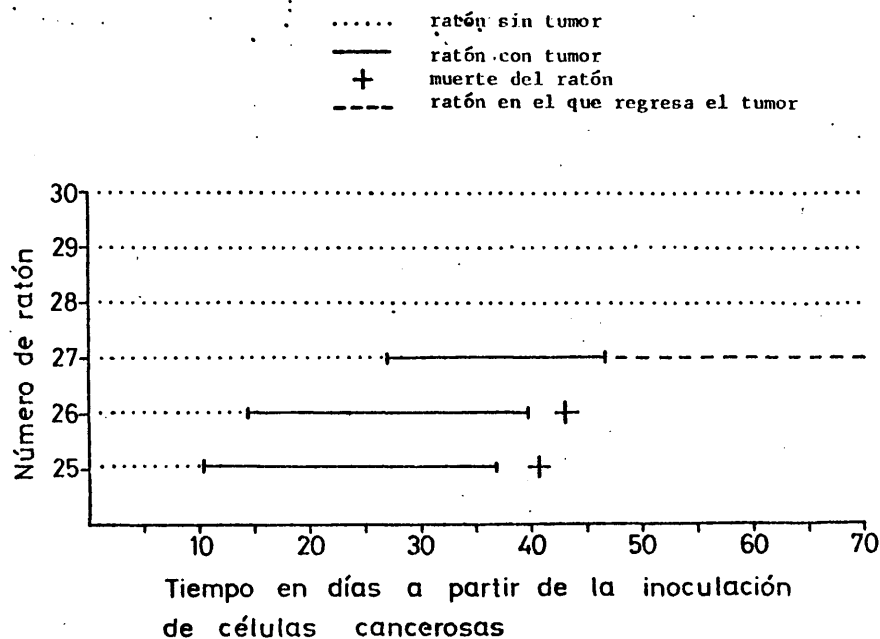
Los animales de este grupo fueron inmunizados con 42 µg de membrana plasmática purificada de células CAEL y después inoculados con 25.000 células CAEL. Cinco animales murieron con tumor y uno desarrolló un tumor que regresó a los 43 días.



FIGURA 70

## PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD

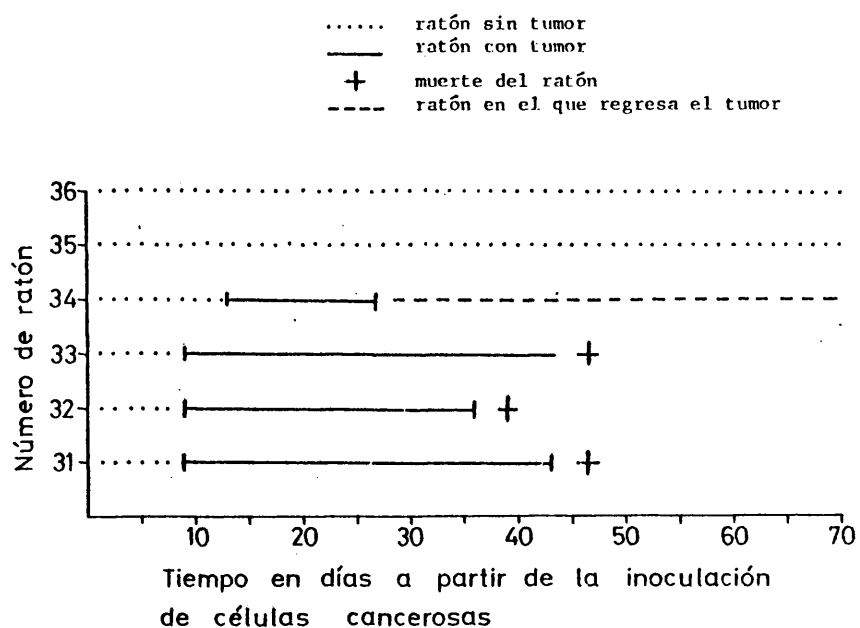
## GRUPO 15: INMUNIZACION CON MEMBRANA PLASMATICA SOLUBILIZADA



Este grupo de animales fué inmunizado con 200  $\mu$ g de membrana plasmática solubilizada de células CAEL y después inoculado con 25.000 células CAEL. Tres animales no desarrollaron tumor, en uno proliferaron las células cancerosas pero regresaron a los 46 días y en dos animales aparecieron sendos tumores que evolucionaron hasta su muerte.

FIGURA 71

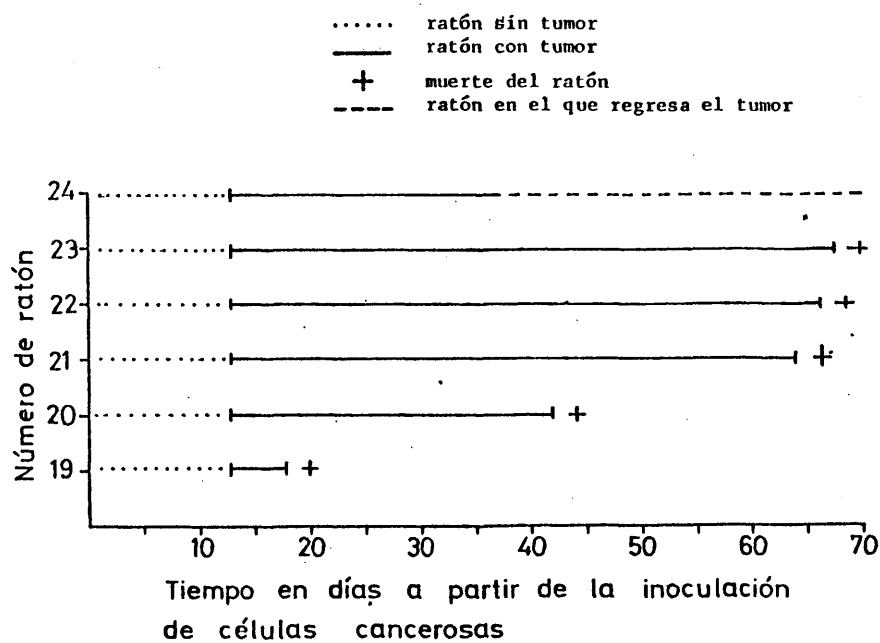
PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD  
GRUPO 16: INMUNIZACION CON MEMBRANA PLASMATICA SOLUBILIZADA



Este grupo de animales fue inmunizado con 100  $\mu$ g de membrana plasmática solubilizada con 25.000 células CAEL. Desarrollaron tumores en 4 animales evolucionando 3 hasta la muerte del animal y regresando uno a los 27 días. En los animales restantes no aparecieron tumores.

FIGURA 72

PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD  
GRUPO 17: INMUNIZACION CON MEMBRANA PLASMATICA SOLUBILIZADA



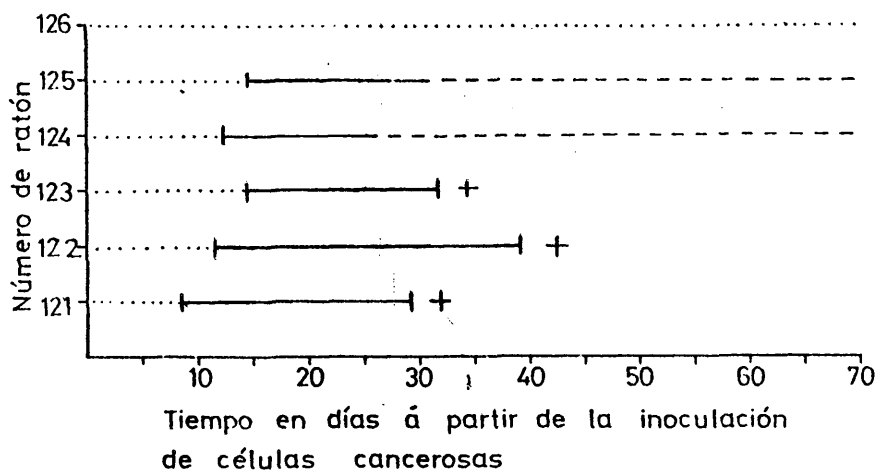
Este grupo de animales fue inmunizado con 42  $\mu$ g de membrana plasmática solubilizada de células CAEL y después inoculado con 25.000 células CAEL. Todos los animales desarrollaron tumores, cinco de ellos murieron en tanto que uno regresó a los 38 días.

FIGURA 73

## PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD

GRUPO 18: INMUNIZACION CON MEMBRANA PLASMATICA SELECCIONADA

..... ratón sin tumor  
 ——— ratón con tumor  
 + muerte del ratón  
 - - - - ratón en el que regresa el tumor

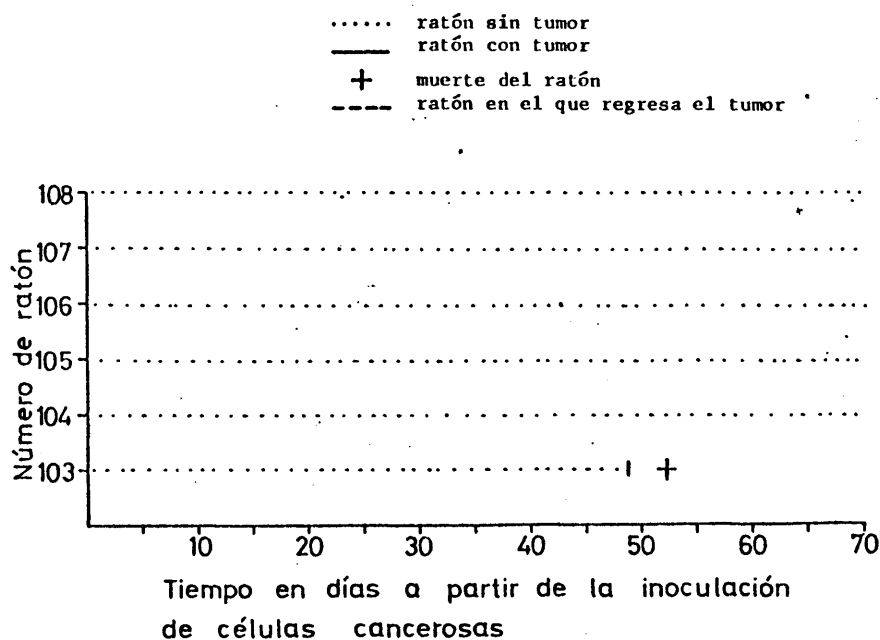


A los animales de este grupo se les inmunizó con 13,3  $\mu$ g de membrana plasmática seleccionada de células CAEL y después se les inoculó con 25.000 células CAEL. Tres animales murieron con tumor entre los 30 y los 40 días; en dos se presentaron sendos tumores que regresaron a los 27 y 32 días respectivamente; uno de los animales permaneció libre de tumor.

FIGURA 74

## PRUEBAS DE INMUNIZACION

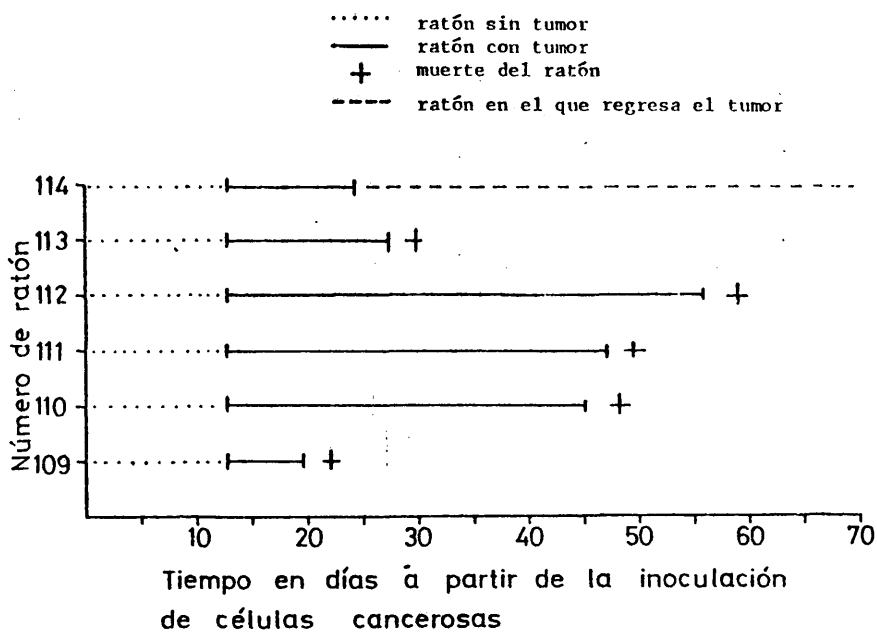
## GRUPO 19: INMUNIZACION CON CRUDO ANTIGENICO B



Este grupo de animales se inmunizó con 840  $\mu$ g de crudo antigénico B de células CAEL, siendo luego inoculada con 25.000 células CAEL. Ninguno de los animales desarrolló tumor aunque uno de ellos murió por causas inespecíficas.

FIGURA 75

PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD  
GRUPO 20: INMUNIZACION CON CRUDO ANTIGENICO B

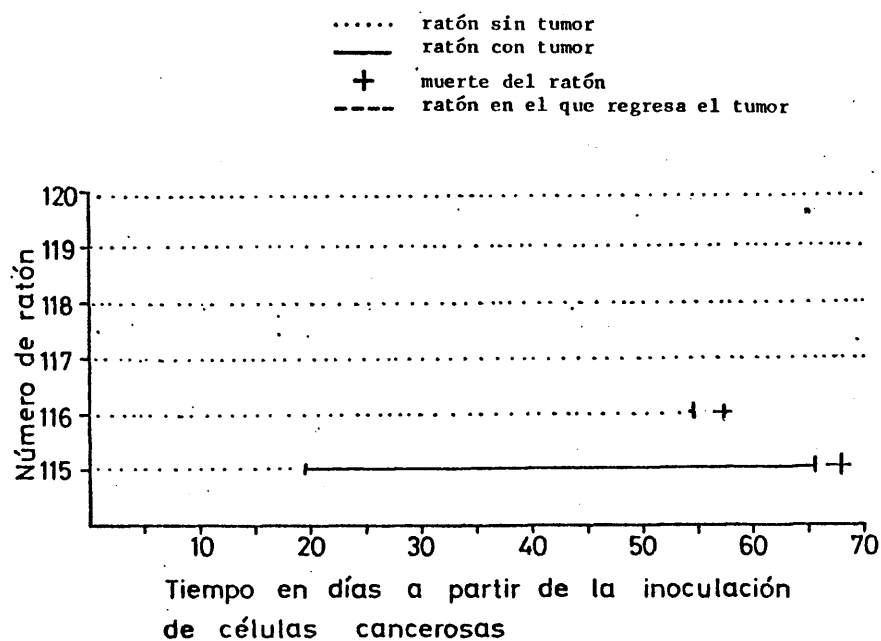


Este grupo de animales se inmunizó con 420  $\mu$ g de crudo antigénico B de células CAEL y después se inoculó con 25.000 células CAEL. Todos los animales desarrollaron tumor; en uno regreso a los 25 días y los demás murieron a consecuencia del mismo.

FIGURA 76

## PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD

GRUPO 21: INMUNIZACION CON PROTEINAS SOLUBLES DE CELULAS CANCEROSAS



Los animales de este grupo fueron inmunizados con 1680  $\mu$ g de proteínas solubles (citosol) de células CAEL y después inoculados con 25.000 células CAEL. Solamente uno de los animales desarrolló tumor y murió a consecuencia del mismo. Cinco animales se mantuvieron libres de tumor aunque uno de ellos murió por causas inespecíficas.

TABLA XLII

RESULTADOS RECOGIDOS DE LAS PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD

TRATAMIENTO		GRUPO N°	A	B	C	D	E	F	G	H
TIPO	CANTIDAD TOTAL DE ANTIGENOS µg									
NINGUNO (*)	-	1	6	0	0	0	0	6	0	100
NINGUNO (**)	-	2	0	0	6	6	0	0	0	0
CRUDO ANTIGENI- CO A (CELULAS NORMALES )	2000 1000 500	3 4 5	1 0 0	0 0 0	5 6 6	4 6 5	0 0 0	1 0 0	1 0 1	16 0 0
CRUDO ANTIGENI- CO A (CELULAS CAEL)	4200 2100 2000 1000 500	6 7 8 9 10	5 6 5 4 1	1 0 0 0 1	0 0 1 2 4	0 0 1 2 4	0 0 0 0 0	6 6 5 4 2	0 0 0 0 0	100 100 83 66 33
MEMBRANAS PURIFICADAS	400 200 100 42	11 12 13 14	6 5 3 0	0 0 0 1	0 1 3 5	0 0 3 5	0 0 0 0	6 5 3 1	0 1 0 0	100 83 50 16
MEMBRANAS SOLUBILIZADAS	200 100 42	15 16 17	3 2 0	1 1 1	2 3 5	2 3 5	0 0 0	4 3 1	0 0 0	66 50 16
MEMBRANAS SE- LECCIONADAS	13,3	18	1	2	3	3	0	3	0	50
CRUDO ANTIGENI- CO B (CELULAS CAEL)	840 420	19 20	6 0	0 1	0 5	0 5	1 0	5 1	0 0	83 16
CITOSOL	1680	21	5	0	1	1	1	4	0	66
			A	B	C	D	E	F	G	H

A: ANIMALES QUE NO DESARROLLAN TUMOR.

B: ANIMALES QUE DESARROLLAN TUMOR Y LES REGRESA.

C: ANIMALES QUE DESARROLLAN TUMOR Y NO REGRESA.

D: ANIMALES QUE MUEREN CON TUMOR.

E: ANIMALES QUE MUEREN SIN TUMOR.

F: ANIMALES VIVOS SIN TUMOR (NUNCA TUMOR + REGRESION TUMORAL).

G: ANIMALES VIVOS CON TUMOR A LOS 70 DIAS.

H: EFECTIVIDAD DE LA INMUNIZACION %.

(\*) Grupo control normal: animales normales que no recibieron tratamiento alguno.

(\*\*) Grupo control canceroso: animales inoculados con 25.000 células cancerosas.



DISCUSION

## I. INTRODUCCION Y ESQUEMA GENERAL DEL PROYECTO

Determinar la existencia de antígenos específicos en aquellos procesos que cursan con alteraciones inmunológicas es muy importante.

Una vez conocida su existencia es esencial su aislamiento y caracterización.

La naturaleza de los antígenos permite deducir muchos datos sobre la etiología y la patogenia de los procesos en cuestión.

Pero, además, cuando se piensa en inmunoterapia, los antígenos específicos son los únicos que permiten hacer una inmunoterapia activa genuina y, también, los únicos que permiten inmunizar animales para obtener anticuerpos específicos y linfocitos T inmunocompetentes específicamente sensibilizados.

La llamada inmunoterapia activa específica del cáncer, que se encuentra en fase experimental, utiliza células cancerosas enteras u homogenadas, en las cuales los antígenos oncoasociados y oncoespecíficos forman la menor parte, o extractos brutos que siguen estando compuestos de mezclas antigénicas que dificultan las respuestas adecuadas por parte del organismo.

Parece definitivamente establecido que todos los tumores elaboran antígenos oncoasociados y oncoespecíficos y que el organismo pone en marcha reacciones de defensa inmunológica humorales y celulares contra las células cancerosas. Cada tipo de tumor contiene diferente número y cantidad de los mismos

y en cada tumor la clase y concentración de antígenos varía con la evolución el mismo.

La membrana plasmática no ofrece una equivalencia funcional en toda su superficie, sino una especialización por regiones y una asimetría en el transporte (A.K. Solomon y M. Karnovsky, 1978). Los antígenos no son una excepción, de manera que su cantidad, distribución y actividad influyen notablemente en su capacidad de inducción inmunológica, pudiendo hacerla eficaz o ineficaz (Y. Alvarez-Rodríguez y cols. 1976).

Finalmente, es sumamente variable la inmunogenicidad de los antígenos de las células cancerosas, al grado de que muchos de ellos no pueden inducir una respuesta inmunológica eficaz. Este fenómeno de incapacidad inmunogénica intrínseca, que debe resolverse cuando se presente en relación con una posible inmunoterapia o valoración antigénica, es independiente del hecho de que los neoplasmas con antígenos suficientemente inmunogénicos pueden no resultar eficaces para producir una respuesta inmunodefensiva adecuada por desfase entre la cantidad inducida de linfocitos B y T inmunocompetentes específicamente sensibilizados necesarios para hacer regresar al tumor.

Finalmente, el organismo puede ser incapaz de respuestas inmunológicas adecuadas.

En todos estos casos es fundamental conocer el estado inmunológico del organismo portador de un tumor, así como las causas de los fallos y la detección de las alteraciones debidas a la propia enfermedad, con el ánimo de corregirlas, porque sin ello la inmunoterapia podría ser inútil.

Para resolver muchos de los problemas planteados por la etiopatogenia y la inmunoterapia del cáncer es necesario, antes que ninguna otra cosa,

aislar los antígenos oncoasociados y oncoespecíficos. Este es el objetivo del presente proyecto, que hemos conseguido alcanzar con éxito.

Para ello hubo que diseñar un proyecto complejo, que es el esquematizado en la figura 1.

Había que decidir la fuente de la que se intentaría aislar los antígenos oncoasociados y oncoespecíficos. Podría ser la célula entera o alguna fracción subcelular. Nos decidimos por la membrana plasmática.

La membrana plasmática tiene una gran importancia en el comportamiento celular y en las relaciones intercelulares (B.D. Gomperts, 1977) y sufre cambios importantes en la célula cancerosa (D.F.H. Wallach, 1975).

El siguiente problema era, evidentemente, poder aislar los antígenos específicamente relacionados con la célula cancerosa, eliminando los de la célula normal.

Para conseguirlo, utilizamos un sistema indirecto:

Primero obtener inmunoglobulinas anticancerosas específicas, aprovechando una técnica de inmunización selectiva en conejos quimera inmunológica propia del Departamento (Alvarez-Rodríguez y cols., 1975, 1976, 1979).

Segundo, hacer una cromatografía de afinidad utilizando los anticuerpos obtenidos por el procedimiento anterior como ligando fijado a Sepharosa 4B activada con CNBr y ofertando fragmentos de membrana plasmática de células cancerosas solubilizada por ondas ultrasónicas. Teóricamente, todas las especies proteicas serían eluidas de la columna a pH 7, en tanto que los antígenos específicos serían retenidos por los anticuerpos específicos conjugados al gel y podrían ser eluidos a continuación a pH 2,8.

## II. OBTENCION DE FRAGMENTOS DE MEMBRANA PLASMATICA SOLUBILIZADA

Utilizamos la membrana plasmática de células cancerosas pensando en que las principales reacciones inmunológicas entre los antígenos por una parte y los anticuerpos, linfocitos B y linfocitos T por otra, que llevan a la destrucción tumoral, tienen lugar a nivel de la superficie celular.

En el montaje de la técnica de obtención de la membrana plasmática comenzamos por establecer las condiciones necesarias para la homogeneización de cada tipo celular, con objeto de conseguir la ruptura de las células con el menor daño posible de los núcleos, evitando así la contaminación con fragmentos de membrana nuclear, como se indica en "Resultados", apartado I; tablas IV a VIII; figuras 7 a 10.

El homogenado celular se sometió a ultracentrifugación en gradiente discontinuo de densidad en sacarosa 48-37 % (p/v) ("Resultados", apartado I.A.2; tablas X a XIII). La banda de las membranas se forma en la interfase entre las capas de sacarosa al 37 y al 41 %, que corresponde a una densidad de 1,16.

En el apartado B de "Resultados" se indica la proporción que representan las proteínas de la membrana plasmática en relación con las proteínas celulares totales. Dicha proporción es del 1,3 % para las células HeLa, 1,2 % para las células CAEL y 2,5 % para las células normales.

Esta proporción de proteínas constituye nuestro punto de partida para cálculos ulteriores.

Como la membrana plasmática estaba destinada a cromatografía de afini-

dad y, a fin de cuentas, a obtención de antígenos que resulten útiles para ser caracterizados y utilizados individualmente para inmunización, era necesario proceder a su solubilización ("Resultados", apartado II).

Pensando que la fragmentación con ondas ultrasónicas sería la que menos desnaturaliza a los antígenos, se procedió a la solubilización ultrasónica de la membrana plasmática.

En las condiciones ensayadas, es decir, sonicación en NaCl 0,14 M con Tris 20 mM, pH 7,0 conteniendo Tritón X-100 al 0,05 % y fluóruro de fenilmetil-sulfonil 100  $\mu$ M como inhibidor de las enzimas proteolíticas ("Material y Métodos", apartado V), los fragmentos de membrana plasmática solubilizada sufrían un proceso de agregación que comenzaba inmediatamente y progresaba durante 96 horas, al cabo de las cuales se estabilizaba.

Esto nos llevó a estudiar aquellas condiciones que pudieran favorecer la agregación, como las variaciones en la fuerza iónica, pH y presencia de cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ("Resultados", apartado II).

Como es frecuente que las muestras se conserven congeladas cuando va a transcurrir un período más o menos largo después de su obtención, analizamos también el efecto de la congelación sobre la agregación.

Observamos que la agregación es similar a fuerzas iónicas determinadas por la presencia del NaCl entre 0,01 M y 1,0 M, a valores de pH entre 2,8 y 10,0 y en presencia o ausencia de  $\text{CaCl}_2$  1 mM. Decidimos, por tanto, conservar las condiciones originales de solubilización y utilizar la membrana solubilizada lo más pronto posible a partir de su obtención, cuando la agregación es mínima.

En cambio, vimos que no era conveniente la congelación, porque favore-

cía la agregación.

Al analizar la relación entre agregación y peso molecular de los fragmentos de membrana plasmática solubilizada se vio que las moléculas menores de 25.000 D se agregan menos que las de peso molecular mayor.

Comprobamos pues que cierto grado de agregación, aunque pudiera restar rendimiento a las etapas experimentales posteriores, era inherente al procedimiento, razón por la cual seguimos adelante.

### III. OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTICANCEROSOS ESPECIFICOS

Los fragmentos de membrana plasmática de células cancerosas solubilizada por ondas ultrasónicas, los cuales contienen alrededor del 1,25 % de las proteínas celulares totales, están compuestos por un gran número de especies moleculares y, por lo tanto, de antígenos. La mayor parte de ellos son antígenos compartidos por las células normales y cancerosas homólogas, isogénicas o alogénicas, existiendo solamente una pequeña cantidad de antígenos oncoasociados y oncoespecíficos.

Por lo tanto, para obtener los antígenos propios de la célula cancerosa, por cromatografía de afinidad, era absolutamente necesario disponer de anticuerpos específicos, que se consiguieron por inmunización selectiva en conejos quimera inmunológica, inmunotolerantes a los antígenos normales, según el método de Y. Alvarez-Rodríguez y cols., 1975, 1976, 1979) ("Material y Métodos", apartados VI y VII).

Antes que nada, se comprobaron todas las etapas de obtención de inmunoseros mediante experimentos control ("Resultados", apartado III.A).

Para la comprobación ulterior de la cromatografía de afinidad utilizando un sistema peroxidasa-Ig antiperoxidasa, de fácil seguimiento, se prepa-

raron inmunosueros anti-peroxidasa, realizando la prueba del anillo, que resulta útil para los anticuerpos precipitantes pero no para los solubles, como son muchos de los antígenos cancerosos que se liberan de la célula.

Se dedujo el título del inmunosero anti-peroxidasa por doble inmunodifusión de Ouchterlony en agar al 1 %, se construyó una curva de precipitación cuantitativa y se calcularon el punto de equivalencia y la valencia antigénica, que en el caso de los anticuerpos anti-peroxidasa es 4.

A continuación se obtuvieron inmunosueros anti-membrana plasmática comparando la inmunización tradicional con la inmunización selectiva en conejos quimerizados ("Resultados", apartado III.B), comprobando la bondad del segundo procedimiento para obtener anticuerpos anticancerosos específicos sin contaminación de anticuerpos contra los antígenos normales que posee la célula cancerosa ("Resultados", apartado III.B.c y tabla XXI). En todos los casos la reacción antígeno-anticuerpo mostró su dependencia de la presencia de complemento.

Los inmunosueros anti-membrana plasmática se comprobaron con la prueba del anillo y se titularon en microplacas de Terasaki ("Resultados", apartado B.2; tablas XIX y XX; figuras 26 y 27).

Las inmunoglobulinas o anticuerpos específicamente anticancerosos contenidos en los inmunosueros se aislaron mediante reciclo cromatográfico ascendente en Sephadex G-150 superfino.

Para poner a punto la técnica en las mejores condiciones se hicieron ensayos previos con objeto de determinar el empleo de reciclo discontinuo o continuo, que hicieron decidir en favor del discontinuo y el tamaño conve-

niente de la columna en función del volumen de suero sanguíneo a cromatografiar ("Resultados", apartado IV). Para comprobar la pureza de las gammaglobulinas eluidas se utilizó la relación  $D.O._{278nm}/D.O._{251nm}$  para la que obtuvimos valores alrededor de 2,8 para las gammaglobulinas humanas y de 2,6-2,7 para las gammaglobulinas de conejo.

Ensayamos, finalmente, la actividad de anticuerpo de las inmunoglobulinas anti-membrana purificadas mediante pruebas de citotoxicidad.

Comprobamos que las inmunoglobulinas purificadas conservan el título citotóxico del antisuero original y que la reacción antígeno-anticuerpo depende de la presencia de complemento.

No obstante, hay que tener en cuenta que si cualitativamente la reacción se conserva, desde el punto de vista cuantitativo la cromatografía para purificar las inmunoglobulinas supone cierta pérdida de material, si se compara la cantidad ofertada con la cantidad eluida.

#### IV. OBTENCION DE ANTIGENOS CANCEROSOS ESPECIFICOS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

En el apartado anterior señalamos que era esencial obtener anticuerpos anticancerosos puros para aislar los correspondientes antígenos cancerosos específicos a partir de una mezcla antigénica.

Antes de proceder a la cromatografía de afinidad entre Sepharosa 4B (CNBr) conjugada a inmunoglobulinas anti-membrana cancerosa solubilizada y antígenos de membrana cancerosa solubilizada, realizamos ensayos previos para determinar si el ligando se desnaturalizaba en el proceso ("Resulta-



dos", apartado V.A.1).

Ensayamos dos sistemas, invirtiendo el producto utilizado como ligando. En un caso se empleó Sepharosa 4B (CNBr)-peroxidasa y se ofrecieron Ig anti-peroxidasa y en otra Sepharosa 4B (CNBr)-Ig anti-peroxidasa añadiendo peroxidasa para reaccionar. En el primer caso, y siempre refiriéndonos a los sistemas peroxidasa-anti-peroxidasa, la peroxidasa puede sufrir repetidos cambios de pH neutro (7,0) a pH ácido (2,8) sin que sufra desnaturalización alguna, lo cual permite la reutilización de la columna para extracciones sucesivas de Ig anti-peroxidasa. Contrariamente, en el caso de usar Ig anti-peroxidasa como ligando, se consigue una separación ideal de peroxidasa (antígeno) la primera vez, pero los sucesivos cambios entre los pH 7,0 y 2,8 van desnaturalizando a las inmunoglobulinas, cuyo título de anticuerpo, valorado por inmunodifusión, baja a la mitad del valor original al cabo de cuatro cambios de pH. Esto indica que la columna puede utilizarse una o dos veces para aislar antígenos, pero que no conviene su reutilización múltiple por desnaturalización de las inmunoglobulinas.

Se determinaron también, usando peroxidasas e Ig anti-peroxidasas, las condiciones a elegir en relación con la cantidad de ligando a fijar, de sustancia a ofertar para su reacción con el ligando y la intensidad de la reacción antígeno-anticuerpo eluyendo con glicina y con glicina-dioxán, ambos a pH 2,8 ("Resultados", apartados V.A.2 y V.B.1).

Es evidente que la cantidad de proteínas ofertadas que se fijan al ligando sobre las bolas de gel depende de la cantidad de ligando y que una vez saturados los puntos reactivos, el exceso de material ofertado se pierde saliendo junto con el eluato inespecífico. En el punto de equivalencia, 1 mg de peroxidasas reacciona con 66,6 mg de inmunoglobulinas anti-peroxida-

sas.

Por otra parte, en nuestros ensayos encontramos siempre dos fracciones, en función de la intensidad de la reacción antígeno-anticuerpo. Una con moléculas menos fuertemente unidas, que es eluída con glicina a pH 2,8 y otra con mayor intensidad de unión que se eluye con la mezcla de glicina-dioxán a pH 2,8. En los sistemas peroxidasa-anti-peroxidasa ensayados, la combinación de glicina y dioxán consigue eluir entre el 30 y el 50 % de las proteínas específicas, lo que indica la necesidad de mancomunar las fracciones eluídas con glicina y con glicina-dioxán para obtener un buen rendimiento ("Resultados", apartado 5.B.1).

Cuando entramos de lleno a la separación de antígenos cancerosos específicos, nos planteamos la necesidad de resolver el volumen mínimo de lavado para eluir los antígenos inespecíficos, así como la cantidad de antígenos inespecíficos retenidos por la Sepharosa 4B (CNBr), sola o conjugada a inmunoglobulinas inespecíficas y no citotóxicas ("Resultados", apartado V.C.1).

En el primer ensayo de obtención de antígenos oncoasociados y oncoespecíficos diseñamos un sistema de microcolumnas para cromatografía de afinidad empleando pequeñas cantidades de antígenos marcados con hidrolizado proteico-<sup>14</sup>C ("Resultados", apartado V.C.1.b).

Las microcolumnas, de 2 ml de capacidad total, terminadas en forma de cono truncado, contenían 750 µg de Sepharosa 4B (CNBr) conjugada a inmunoglobulinas anticancerosas específicas preparadas contra membrana plasmática solubilizada por inmunización selectiva de conejos quimera inmunológica. Se ofertaron a cada columna 5,0 mg de antígenos (fragmentos de membrana plas-

mática solubilizada de células CAEL), a una concentración de 0,5 mg/ml, marcados radiactivamente con 0,5  $\mu\text{Ci/ml}$  de hidrolizado proteico- $^{14}\text{C}$  uniformemente marcado, poseedor de una actividad específica de 50  $\mu\text{Ci/ml}$ . El análisis del material eluido mostró que se necesitan por lo menos 10 ml para que salgan todos los antígenos inespecíficos ("Resultados", apartado V.C.1.b.4); tablas XXXI y XXXII; figura 51). Por esta razón eluímos siempre con 15 ml de buffer NaCl 0,14 M Tris 20 mM pH 7,4. A continuación se llevó a cabo la elusión de los antígenos específicos con 6 ml de buffer glicina pH 2,8.

El estudio del tipo de material eluido con la glicina a pH 2,8 mostró que se retenía una pequeña cantidad de antígenos inespecíficos ("Resultados", apartado V.C.1.b.4; tablas XXXIII y XXXIV; figura 52). Dicha cantidad fue en promedio de 7,5  $\mu\text{g}$ , que deben ser descontados de la cantidad de antígenos específicos.

En el experimento concreto cuyos resultados se exponen en las tablas XXXV y XXXVI y en la figura 53, los antígenos totales eluidos fueron 16,0 y 15,75  $\mu\text{g}$  en sendas microcolumnas (promedio 15,9  $\mu\text{g}$ ) y los antígenos inespecíficos retenidos por las columnas fueron 6,25 y 7,5  $\mu\text{g}$  (promedio 6,9  $\mu\text{g}$ ). Es decir, se habían obtenido 9,0  $\mu\text{g}$  de antígenos oncoasociados y oncoespecíficos. La metodología empleada hace pensar que se trata de una mezcla de los antígenos propios de la célula cancerosa libres de los antígenos normales de la misma. En este experimento fue imposible hacer pruebas inmunológicas con los antígenos obtenidos debido a su escasa cantidad absoluta.

Por los análisis mencionados en la sección de "Resultados", apartado I.B., sabemos que hay 280  $\mu\text{g}$  de proteínas por  $10^6$  células CAEL. Por consi-

guiente, como las proteínas de la membrana representan el 1,2 % de las proteínas celulares totales, existen alrededor de 3,36  $\mu\text{g}$  de proteínas de membrana plasmática por  $10^6$  células.

Por otra parte, como se dice en la sección de "Resultados", apartado V.C.1.b.4, a partir de 5,0 mg de antígenos de membrana plasmática se obtuvieron 9,0  $\mu\text{g}$  de antígenos cancerosos específicos, lo cual representa el 0,18 % de las proteínas de membrana y el 0,0023 % o aproximadamente 1 parte por 43.500 de las proteínas celulares totales.

Si en 5.000  $\mu\text{g}$  de proteínas de membrana existen 9,0  $\mu\text{g}$  de antígenos cancerosos específicos, en los 3,36  $\mu\text{g}$  de proteínas de membrana por  $10^6$  células CAEL habrá 0,006  $\mu\text{g}$  de antígenos específicos por  $10^6$  células.

Los datos de los últimos párrafos se recogen en la tabla XLIII.

**TABLA XLIII**  
**PROTEINAS Y ANTIGENOS ONCOASOCIADOS Y ONCOESPECIFICOS**  
**DE LAS CELULAS CAEL**

Proteínas celulares totales -----	280 $\mu\text{g}/10^6$ células
Proteínas de la membrana plasmática -----	3,36 $\mu\text{g}/10^6$ células
Proporción de proteínas de membrana en relación a las proteínas totales -----	1,2 %
Antígenos oncoasociados y oncoespecíficos de la membrana plasmática -----	0,066 $\mu\text{g}/10^6$ células
Proporción de los antígenos oncoasociados y oncoespecíficos de la membrana plasmática en relación a las proteínas totales de membrana -----	0,18 %
Proporción de los antígenos oncoasociados y oncoespecíficos de la membrana plasmática en relación a las proteínas celulares totales ---	0,0023 % o 1 parte por 43.500

Tras la comprobación de todas las fases del proceso mediante la cromatografía de afinidad en microcolumnas de Sepharosa 4B (CNBr), realizamos un estudio de los antígenos cancerosos específicos: a) comparando las proteínas de las células cancerosas que reaccionan con anticuerpos anti-antígenos normales y con anticuerpos anti-antígenos cancerosos conjugados al gel, b) registrando la especificidad cancerosa por inhibición de la citotoxicidad de los anticuerpos anti-cancerosos específicos cuando se absorben con los antígenos obtenidos y c) haciendo pruebas de inmunogenicidad protectora con los antígenos obtenidos en animales inoculados con células cancerosas.

En las columnas con Sepharosa 4B (CNBr)-anticuerpos anti-antígenos normales reaccionó el 17 % de las proteínas de membrana cancerosa ("Resultados", apartado V.C.2).

Las tablas XXXVII y XXXVIII muestran que el anti-suero anti-membrana normal no absorbido con antígenos normales mata a la totalidad de las células CAEL y que conforme el antisuero va siendo absorbido con una mayor cantidad de antígenos va disminuyendo proporcionalmente la citotoxicidad.

Evidentemente se trata de un resultado lógico. El antisuero anti-membrana normal contiene muchos anticuerpos contra los múltiples antígenos que comparten las células normales y cancerosas. Consiguientemente, el suero anti-membrana normal ataca tanto a las células normales como a las células cancerosas (CAEL en este experimento).

Las diferencias entre las cantidades necesarias de antígeno para inhibir la citotoxicidad, según se trate de membrana plasmática o de proteínas eluidas tras la cromatografía de afinidad revela simplemente la concentración de la actividad. La mortalidad baja a 13-15 % cuando el inmunosero

anti-antígenos normales se absorbe con 200  $\mu$ g de membranas solubilizadas de CAEL o con 16  $\mu$ g de proteínas eluidas de CAEL, lo que representa una concentración de 12,5 veces.

Pasando al sistema en el que enfrentamos antígenos de membrana de CAEL con inmunosuero específico contra los antígenos cancerosos de membrana de CAEL, hicimos las observaciones siguientes ("Resultados", V.C.3).

Se eluyeron a pH ácido 80  $\mu$ g de las proteínas ofertadas, que fueron 5 mg. Esto representa el 1,6 %.

Las pruebas de inhibición de la citotoxicidad del inmunosuero anti-membrana plasmática de CAEL que contiene anticuerpos anticancerosos específicos por inmunización selectiva de conejos quimera inmunológica, por absorción con membrana solubilizada de células CAEL (tabla XXXIX y figura 54) o con proteínas de la misma eluidas por tratamiento ácido de la Sepharosa 4B (CNBr) conjugada a los anticuerpos (tabla XL y figura 55), mostraron que: a) los anticuerpos anti-cancerosos específicos no absorbidos son capaces de matar al 100 % de las células cancerosas; b) la absorción del inmunosuero específicamente anti-canceroso con cantidades crecientes de antígenos cancerosos específicos va disminuyendo el efecto citotóxico del inmunosuero; c) la citotoxicidad del 15 % se alcanza absorbiendo con 200  $\mu$ g de fragmentos de membrana plasmática solubilizada y con 7,0  $\mu$ g de antígenos cancerosos específicos, lo que corresponde a una concentración de 28,6 veces.

Finalmente, se llevaron a cabo pruebas de tumorigenicidad inoculando células cancerosas y estudiando la inmunogenicidad de los antígenos anti-cancerosos específicos y su efecto protector sobre el desarrollo tumoral

("Resultados", apartado VI). Además, se comparó la inmunogenicidad de los antígenos anticancerosos específicos procedentes de membrana plasmática, con la actividad inmunogénica de crudos antígenicos, poseedores de mezclas complejas de antígenos.

El estudio se hizo sobre 126 animales, en grupos de 6, que recibieron los distintos materiales antígenicos o sirvieron de control.

La tabla XLI muestra la forma en que se realizaron las pruebas de inmunogenicidad, tipo de tratamiento, cantidad total y reparto de las dosis de inmunización e inoculación final de células cancerosas (CAEL) a los ratones por vía subcutánea para observar su efecto tumorigénico en cada una de las condiciones experimentales.

Los resultados de cada uno de los 21 grupos de animales estudiados y la evolución seguida dentro de cada grupo por los ratones individualmente considerados, se registran en las figuras 56 a 76.

Por último, en la tabla XLII se han resumido los resultados obtenidos en todas las pruebas de inmunogenicidad.

En los ratones del grupo control formado por animales normales que no recibieron ningún tratamiento, no se observaron tumores (grupo 1).

Contrariamente, en el grupo control canceroso, compuesto por ratones inoculados con células cancerosas, todos los animales desarrollaron tumor (grupo 2).

Utilizando el crudo antígeno A preparado con proteínas de membrana, citoplasma y citosol de células normales a las dosis de 2000, 1000 y 500 µg, no se registró prácticamente efecto protector; la efectividad de la inmunización se redujo a 16 % utilizando 2000 µg de antígenos.

El empleo del crudo antigénico A compuesto de proteínas de membrana, citoplasma y citosol de células cancerosas consiguió una inmunización efectiva en el 100 % de los animales inmunizados con 4200 y 2100  $\mu\text{g}$  de antígenos, reduciéndose a 83, 66 y 33 % en los ratones inmunizados con 2000, 1000 y 500  $\mu\text{g}$  de antígenos respectivamente.

Las membranas aisladas nativas produjeron una inmunización total con 400  $\mu\text{g}$ , bajando a 83 % con 200  $\mu\text{g}$ , 50 % con 100  $\mu\text{g}$  y 16 % con 42  $\mu\text{g}$ .

Usando membrana plasmática solubilizada, 200, 100 y 42  $\mu\text{g}$  de antígenos lograron inmunizar al 60, 50 y 16 % de los ratones, respectivamente.

Los antígenos cancerosos específicos obtenidos por cromatografía de afinidad, referidos en la tabla como "membranas seleccionadas", consiguieron un 50 % de protección contra el tumor a dosis de 13,3  $\mu\text{g}$  de antígeno.

El crudo antigénico B de células cancerosas difiere del crudo antigénico A únicamente por la ausencia de las proteínas del citosol en el primero; 840  $\mu\text{g}$  de antígeno protegieron al 83 % de los animales y 420  $\mu\text{g}$  al 16 %.

En cuanto al empleo de proteínas de citosol únicamente, 1680  $\mu\text{g}$  de antígeno tuvieron una efectividad de inmunización de 66 %.

Aunque los resultados, vistos en conjunto, son muy claros, algunos resultados particulares no pueden interpretarse adecuadamente debido al pequeño número de animales utilizados.

Así, por ejemplo, no tiene fácil explicación el único animal que no desarrolló tumores utilizando crudo antigénico A de células normales. Pudo tratarse de una inhibición de la proliferación cancerosa desde el principio por las grandes dosis de antígenos normales utilizados, de una resistencia del animal, de ambas cosas a la vez e incluso de un error experimental. No



obstante, la evolución tumoral en todos los animales de este grupo fue más lenta que en los ratones control.

Es evidente que todas las fracciones celulares cancerosas poseen antígenos capaces de inmunizar a los animales e inhibir el crecimiento tumoral, pero varía la cantidad de antígenos necesaria para obtener el mismo efecto.

Experimentos realizados para conocer las dosis antigénicas necesarias para una efectividad de inmunización del 100 % nos llevaron a 2200 µg de citosol, 2100 µg de crudo antigénico A, 1000 µg de crudo antigénico B, 500 µg de membrana plasmática solubilizada, 400 µg de membrana plasmática nativa y 26 µg de antígenos cancerosos oncoasociados y oncoespecíficos.

Por lo tanto, los antígenos cancerosos específicos tienen una potencia inmunogénica protectora de la tumorigenicidad experimental producida por la inoculación de células CAEL que es 85 veces superior a los antígenos de citosol, 81 veces mayor que el crudo antigénico A, 38 veces más grande que el crudo antigénico B, 19 veces superior a los antígenos de membrana plasmática solubilizada y 15 veces mayor que la membrana plasmática nativa. La pequeña diferencia en los dos últimos casos se debe posiblemente a que la solubilización por ondas ultrasónicas provoca cierto grado de desnaturalización. A la vez, la solubilización es necesaria para proceder a la cromatografía de afinidad en condiciones adecuadas, por lo que es conveniente buscar la manera de reducirla o intentar otros métodos de solubilización, como los tratamientos enzimáticos.

No hay duda, pues, de que de los sistemas de inmunización ensayados por nosotros, y en nuestras condiciones experimentales, los antígenos cancerosos

específicos de membrana plasmática son los que tienen mayor actividad biológica y son inmunogénicos a menores dosis.

### CONCLUSIONES

Hemos diseñado un proyecto para aislar antígenos oncoasociados y oncoespecíficos que es eficaz.

Combinando diversas técnicas conseguimos una serie de experimentos originales con un objetivo no logrado hasta la fecha.

En suma, indujimos inmunosueros específicos contra los antígenos cancerosos específicos de la membrana plasmática de células CAEL gracias a la inmunización selectiva de conejos quimera inmunológica. Estos animales son inmunotolerantes para los antígenos normales y responden inmunológicamente solo a los antígenos oncoasociados y oncoespecíficos, pero no a la multitud de antígenos normales que comparten la célula normal y cancerosa. Como precaución extra, los inmunosueros anti-cancerosos específicos son absorbidos con antígenos normales, con lo cual se eliminan anticuerpos anti-antígenos normales residuales.

Los anticuerpos anti-antígenos cancerosos específicos los purificamos mediante reciclo cromatográfico ascendente en columnas de gel de dextrano con partículas de 10-40  $\mu$ m (Sephadex G-150 superfino, de Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala) y se utilizaron como ligando para cromatografía de afinidad en gel de agarosa activada con bromuro de cianógeno (Sepharosa 4B activada con CNBr, de Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala).

Para ofertar a la columna de Sepharosa 4B (CNBr) conjugada a Ig anti-antígenos cancerosos de membrana plasmática de células CAEL se utilizaron fragmentos de membrana plasmática de células CAEL aislada por ultracentrifugación.

gación en gradiente discontinuo de sacarosa y solubilizada por ondas ultrasónicas.

Las pruebas de inmunodifusión, inmunolectroforesis, inhibición de la citotoxicidad de los inmunosueros anticancerosos sobre las células CAEL cuando son absorbidos con antígenos cancerosos específicos e inmunización protectora de los antígenos cancerosos específicos sobre la tumorigenicidad tras inoculación subcutánea de células CAEL a ratones Swiss permitieron confirmar que hemos aislado los antígenos oncoasociados y oncoespecíficos.

Las pruebas de inmunogenicidad muestran que la actividad biológica de los antígenos cancerosos específicos es muy superior a la de ningún otro sistema antigénico.

Es obvio que hemos alcanzado únicamente la primera aunque obligada etapa.

Desde luego, convendrá analizar las cantidades de antígenos cancerosos específicos que son eluidos tras el tratamiento ácido con glicina solamente y con glicina-dioxán, con objeto de comprobar si existen complejos antígeno-anticuerpo de diferente fuerza de unión.

Será necesario obtener antígenos cancerosos específicos en las cantidades convenientes para su individualización y caracterización por procedimientos bioquímicos y serológicos y, finalmente, integrar en un proyecto de inmunoterapia el complejo antigénico específicamente canceroso o los antígenos cancerosos específicos individuales que se lleguen a mostrar más intensamente inmunogénicos.

BIBLIOGRAFIA

- Abelev, G.I.: Acta UICC, 19: 80 (1963).
- Alexander, P.: Foetal antigens in cancer. Nature, 235: 137-140 (1972).
- Alvarez, Y., Alvarez, J., y Valladares, Y.: Activity of specific antibodies against Ehrlich ascites cancer cells. 29th Congress and Festival of the International Scientific Film Association, Eindhoven (1975).
- Alvarez-Rodríguez, Y., Alvarez-Noves, J. y Valladares, Y.: Application of time-lapse cinematography to the study of antigen-antibody reactions. Microcinematography as a Research Method in Cytology. 3rd Colloquium held in Hradec Králové (Czechoslovakia), pp. 8: 44-45 (1976).
- Alvarez-Rodríguez, Y., Alvarez-Noves, J. y Valladares, Y.: Activity of specific antibodies against Ehrlich ascites cancer cells. Rev. Esp. Oncología, 26: 485-512 (1979).
- Bergstrand, C. y Czar, B.: Scand. J. Clin. Lab. Invest., 9: 227 (1957).
- Birks, J.B.: The theory and practice of scintillation counting. Pergamon Press, Oxford y Londres (1967).
- Buffe, D., Rimbaut, C., Lemerle, J., Schweisguth, O. y Burtin, P.: Presence d'une ferropoteine d'origine tissulaire,  $1^{\circ}\alpha_2H$  dans le serum des enfants porteurs de tumeurs. Intern. J. Cancer, 5: 85 (1970).
- Coligan, J.E., Lautenschleger, J.T., Egan, M.L. y Todds, C.W.: Isolation and characterization of carcinoembryonic antigen. Immunochimistry, 9: 377-386 (1972).

- Coombs, R.R.A. y Gell, P.G.H.: Diagnostic and analytical in vitro methods. En Clinical aspects of immunology (P.G.H. Gell y R.R.A. Coombs, directores), 2ª edición. Blackwell, Oxford (1968).
- Crowle, A.J.: Immunodiffusion. Academic Press, 2ª ed. Nueva York y Londres (1973).
- De Robertis, E.D.P. y Grasso: En Histochemistry: Theoretical and applied, (A.G.E. Pearse, director). Churchill Livingstone, Londres (1961), p. 998.
- Determann, H.: Gel chromatography. Gel filtration, gel permeation, molecular sieves. A laboratory handbook. Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg y Nueva York (1968).
- Ehrlich, P.: Carcinomstudien an Mäusen. Arb. Inst. Exp. Ther. Frankfurt, 1: 75-102 (1906).
- Fisher, L.: Gel filtration chromatography, 2ª ed. Vol. 1, Parte II de Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology (T.S. Work y E. Work, directores). Elsevier/North-Holland, Amsterdam (1976).
- Foley, E.J.: Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumor in mice of strain of origin. Cancer Res., 13: 835-837 (1953).
- Fox, B.W.: Techniques of sample preparation for liquid scintillation counting. Vol. 5, Parte I en Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology (T.S. Work y E. Work, directores). Elsevier/North-Holland, Amsterdam (1976).
- Gey, G.O., Coffman, W.D. y Kubicek, M.T.: Cancer Res., 12: 264 (1952).
- Gold, P. y Freedman, S.: J. Exp. Med., 122: 467-481 (1965).

- Comperts, B.D.: The plasma membrane models for structure and function. Academic Press, Nueva York (1977).
- Grabar, P. y Burtin, P.: Immunoelectrophoretic analysis. Elsevier Scientific Publishing Company, Nueva York (1964).
- Green, I.: Genetic control of immune responses. Immunogenetics, 1, 4-21 (1974).
- Gross, L.: Intradermal immunization of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line. Cancer Res., 3: 326 (1943).
- Herberman, R.B.: Immunogenicity of tumor antigens. Biochim. Biophys. Acta, 473: 93-119 (1977).
- Heidelberg, M. y Kendall, F.E.: The precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and homologous antibody: III. A quantitative study and theory of the reaction mechanism. J. Exper. Med., 61: 563 (1935a).
- Heidelberg, M. y Kendall, F.E.: The reaction between crystalline egg albumin and its homologous antibody. J. Exp. Med., 62: 697 (1935b).
- Hirsfeld, L. y Malber, W.: Klin. Wochenschrift, 9: 342 (1930). Citado por P. Alexander (1972).
- Hoffmann-Ostenhof y cols.: Affinity chromatography: biospecific sorption. Proc. Internat. Symp. Vienna, 1977. Pergamon Press, Oxford (1977).
- Hudson, L. y Hay, F.C.: Inmunología práctica. Jims Ed., Barcelona (1978), pp. 169-172.
- Kabat, E.A. y Mayer M.M.: Experimental immunochemistry. Charles C. Thomas, Pub., Springfield, III (1948).

- Krupey, J., Gold, P. y Freedman, S.O., J. Exp. Med., 128: 387-398 (1968).
- Kurstak, E.: The immunoperoxidase technique localization of viral antigens in cell. En Methods in Virology (K. Maramorosch y H. Koprowski, directores), Vol 5. Academic Press, Inc., Nueva York y Londres (1971), pp. 423-444.
- Lamon E.W.: The immunoresponse to virally determined tumor associated antigens. Biochim. Biophys. Acta, 355: 149-176 (1974).
- Lilly, F. y Steeves, R.: Antigens of murine leukemia viruses. Biochim. Biophys. Acta, 355: 105-118 (1974).
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol Chem., 193: 265-275 (1951).
- Nairn, R.C., Fothergill, J.E., McEntegart, M.G. y Porteous, I.B.: Brit. Med. J., 1: 1788 (1962).
- Parker, R.C.: Methods of tissue culture, 3<sup>a</sup> Ed. P.B. Hoeber, Inc. Nueva York (1961).
- Pharmacia Fine Chemicals. Gel filtration. Theory and practice. Uppsala (1979a).
- Pharmacia Fine Chemicals. Affinity chromatography. Principles and methods. Uppsala (1979b).
- Prehn, R.T. y Main, J.M.: Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. J. Nat. Cancer Inst., 18: 769-778 (1957).
- Pritchard, D.G., Todd, C.W. y Egan, M.L.: Chemistry of carcinoembryonic antigen. En Methods in Cancer Research (H. Busch, director), Vol. 14 Academic Press, Nueva York (1978), pp. 55-85.



- Ray, T.K.: A modified method for the isolation of plasma membrane rat liver. Biochim. Biophys. Acta, 196: 1 (1970).
- Schöne, G.: Untersuchungen über Karzinoimmunität bei Mäusen. Münch. Mediz. Wochenschrift, 53: 2517-2519 (1906).
- Slayter, H.S. y Coligan, J.E.: Electron microscopy and physical characterization of the carcinoembryonic antigen. Biochemistry, 14: 2323-2330 (1975).
- Solomon, A.K. y Karnovsky, M.: Molecular specialization and symmetry in membrane function. Harvard University Press (1978).
- Vaage, J. y Agarwal, S.: Serological procedures useful in assays of in vitro cytotoxicity. En Methods in Cancer Research, 14: 1-27 (1978).
- Valladares, Y.: Virus y cáncer. Rev. Esp. Oncología, 24: 485-525 (1977).
- Wallach, D.F.H.: Membrane molecular biology of neoplastic cells. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam y N.Y. 1975.
- Weil, R.: Viral tumor antigens: A novel type of mammalian regulator protein. Biochim. Biophys. Acta, 516: 301-388 (1978).
- Westwood, J.H. y Thomas, P.: Studies on the structure and immunological activity of carcinoembryonic antigen. The role of disulphide bonds. Br. J. Cancer, 32: 708-719 (1975).
- zur Hausen, H.: Oncogenic herpes viruses. Biochim. Biophys. Acta, 417: 1-23 (1975).

